



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Instituto de Biologia**

STEPHANIE KARENINA BAJAY

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *RHIZOPHORA MANGLE*:  
ADAPTAÇÕES DE ÁRVORES EXTREMÓFILAS EM UM CENÁRIO  
DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS

ANALYSIS OF THE *RHIZOPHORA MANGLE*'S TRANSCRIPTOME:  
ADAPTATIONS TO EXTREMOPHILIC TREES WITHIN A SCENARIO  
OF CLIMATE CHANGES

CAMPINAS

2017

STEPHANIE KARENINA BAJAY

STEPHANIE KARENINA BAJAY

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *RHIZOPHORA MANGLE*: ADAPTAÇÕES DE  
ÁRVORES EXTREMÓFILAS EM UM CENÁRIO DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS

ANALYSIS OF THE *RHIZOPHORA MANGLE*' S TRANSCRIPTOME: ADAPTATIONS  
TO EXTREMOPHILIC TREES WITHIN A SCENARIO OF CLIMATE CHANGES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção de título de Mestra em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

*Dissertation presented to the Biology Institute of the University of Campinas in a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Genetics and Molecular Biology, in the area of Plant Genetics and Genetic Breeding.*

*Orientadora:* Prof<sup>ª</sup>. Anete Pereira de Souza

*Coorientador:* Dr. Marcelo Mendes Brandão

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA STEPHANIE  
KARENINA BAJAY E ORIENTADA PELA PROFA.  
DRA. ANETE PEREIRA DE SOUZA.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/11426-1; CAPES, 23038010030/2013-25

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B167a Bajay, Stephanie Karenina, 1989-  
Análise do transcriptoma de *Rhizophora mangle* : adaptações de árvores extremófilas em um cenário de mudanças climáticas / Stephanie Karenina Bajay. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.  
  
Orientador: Anete Pereira de Souza.  
Coorientador: Marcelo Mendes Brandão.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.  
  
1. Mudanças climáticas. 2. Transcriptoma. 3. Adaptação (Biologia). 4. Manguezais. 5. *Rhizophora mangle*. I. Souza, Anete Pereira, 1962-. II. Brandão, Marcelo Mendes, 1974-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Analysis of the *Rhizophora mangle*'s transcriptome : adaptations to extremophilic trees within a scenario of climate changes

**Palavras-chave em inglês:**

Climate changes

Transcriptome

Adaptation (Biology)

Mangrove swamps

*Rhizophora mangle*

**Área de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento

**Titulação:** Mestra em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Anete Pereira de Souza [Orientador]

Renato Vicentini dos Santos

André Fujita

**Data de defesa:** 05-06-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 05 de junho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dr<sup>a</sup>. Anete Pereira de Souza (Orientadora)

Prof. Dr. Renato Vicentini dos Santos

Prof. Dr. André Fujita

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

*À minha família, que sempre me motivou e  
apoiou em todas as fases da vida.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Terezinha e Sergio, maiores e melhores exemplos da minha vida. Obrigada por todo amor, paciência e suporte que me deram base para chegar onde estou.

Aos meus irmãos, pela grande amizade, carinho e companheirismo.

Ao querido grupo mangue, Mariana Vargas e Dr. Gustavo Mori, aos quais pude me espelhar e alimentar um grande carinho pelos manguezais. Grandes companheiros de coleta e curiosos pela ciência, dispetaram em mim um enorme entusiasmo em fazer parte desta pesquisa tão bonita. Pessoas que eu admiro pela posição frente a pesquisa e que me auxiliaram muito através de discussões sempre construtivas.

À Professora Anete Pereira de Souza, pela orientação e principalmente, por me inserir em um grupo de pesquisa exemplar, composto por pesquisadores colaborativos que propiciam um ambiente de muito aprendizado. Agradeço imensamente ao crédito de confiança em meu trabalho e por acreditar e investir em meu crescimento. Em todos os momentos difíceis sempre me fez acreditar na pesquisa e no aprendizado que eu obterei desta, incentivando o enfrentamento de obstáculos e parabenizando pelas conquistas alcançadas.

Ao Dr. Marcelo Brandão, que de maneira acolhedora, acreditou em meu trabalho e me ensinou muito sobre bioinformática. Obrigada por compartilhar do seu admirável conhecimento, permitindo que eu pudesse explorar intensamente meus dados e compreender muito sobre eles. Obrigada pelas inúmeras discussões e pela grande atenção que sempre me deu.

À Dr.<sup>a</sup> Camila Mantello e à Fernanda Ancelmo, queridas amigas, pelos ensinamentos, paciência e longas discussões no desafio de elaborar e estudar um transcriptoma. Obrigada por compartilharem a experiência de vocês e por muitas vezes encararem os desafios de análise, em equipe.

À Dr.<sup>a</sup> Carla Silva e à Natália Murad, pelo grande colaboração neste trabalho. O conhecimento e contribuição de vocês foi fundamental para a elaboração dos resultados. A Dr.<sup>a</sup> Carla me ensinou muito sobre a conectividade do mundo da bioinformática e as análises de bancada, sempre de maneira muito atenciosa. A Natália, por sua vez, me ajudou a elucidar um sentido biológico para todo o meu conjunto de dados.

Às minhas queridas amigas que conheci no laboratório, Isabela, Maria Beatriz, Melina e Rebecca. Foi incrível a convivência com vocês, que de maneira natural, se estendeu muito além da convivência de trabalho e se perpetuaram como grandes amigas da vida. Obrigada pela força que vocês sempre me deram e pelo companheirismo nos meus bons e maus momentos. Das broncas às risadas sem fim, vocês são parte essencial de tudo isso.

Aos meus colegas e amigos do LAGM pela companhia e pelos momentos de descontração. Todos vocês tiveram uma contribuição significativa para o meu crescimento e conhecimento.

À Aline Moraes, auxiliando em cada passo em meu aprendizado para o sequenciamento Illumina, passando um incrível Natal de 2014 visitando nosso querido GAIIX.

À Universidade Estadual de Campinas, ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade e excelência de ensino.

À FAPESP e à CAPES pela bolsa concedida, e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Os manguezais são ecossistemas extremamente importantes em termos de biodiversidade aquática e terrestre, possuindo peculiaridades em termos de características e composição de seus habitats, sendo considerado um ambiente extremo para a sobrevivência de plantas vasculares. No litoral Brasileiro, a composição arbórea dos manguezais é restrita a apenas seis espécies evolutivamente adaptadas à complexidade funcional destes ecossistemas. *Rhizophora mangle* é uma das espécies mais abundantes deste ecossistema na costa Atlântica do litoral Americano. Estudos com marcadores microssatélites neutros na espécie apontaram uma forte estruturação populacional que divide a espécie em dois grandes grupos no Brasil: um ao norte e outro ao sul do Rio Grande do Norte. O estudo genômico de *R. mangle* pode fornecer um acréscimo às informações já existentes sobre mecanismos que influenciam na distribuição da diversidade e nas respostas adaptativas desta planta ao ambiente que ocupa. Apesar de ser conhecida a importância dos manguezais na estabilidade geomórfológica da linha de costa, na preservação da biodiversidade e na manutenção dos seus serviços ecossistêmicos, estes ecossistemas estão constantemente ameaçados pelas ações antrópicas e pelas mudanças climáticas globais (MCG). A capacidade de adaptação e regeneração das espécies verdadeiras de mangue face às perturbações e mudanças nas condições ambientais é dependente, além das características físico-ambientais de cada ambiente de mangue, das adaptações fenotípicas e genotípicas em resposta as condições ambientais. Este projeto propõe o sequenciamento do transcriptoma e elaboração do perfil de expressão gênica de indivíduos que caracterizem populações naturais de *R. mangle* nos extremo sul e norte da sua ocorrência na costa brasileira. Este estudo visa compreender como diferentes pressões seletivas associadas às MCG podem afetar os padrões e níveis da expressão gênica em populações naturais de *R. mangle*, permitindo a elaboração de melhores estratégias para conservação e manejo dos recursos genéticos de *R. mangle* e de seus habitats.

Utilizando os dados do sequenciamento pela técnica de RNA-seq de *R. mangle*, foram testadas montagens *de novo* com três software de montagem, CLC, Trinity e Mira. A montagem final do transcriptoma foi gerada a partir da união entre a montagem gerada pelo Mira e pelo Trinity, mantendo os transcritos comuns e hibridando os transcritos únicos de cada montagem. Desta forma, foi possível obter melhores métricas de montagem.

Um total de 50.379.733 reads paired-end foram utilizadas para a montagem *de novo* de *R. mangle* em 72.054 unigenes com N50 de 1350 pb. Um total de 34% de contigs/unigenes



foram anotados no banco de dados Swiss-Prot e 43,86% de contigs/unigenes anotados no Non-Redundant Protein Database (NR) do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Foram identificadas 22.669 ORFs completas nos transcritos de *R. mangle* e um total de 18.888 contigs forneceu informações de domínios e famílias de sequências de proteínas identificadas pela ferramenta InterProScan. Foram também identificadas 11.751 repetições de sequências simples (SSRs) e 46.508 variantes SNPs no alinhamento das reads das amostras de Santa Catarina e 87.813 SNPs nas reads das amostras do Pará. Dentre as variantes SNPs detectadas, 20.741 foram comuns entre ambas populações. Através da anotação funcional por termos de ontologia gênica (GO), foram identificados 159 termos em " response to stress", que podem estar associados ao ambiente ostil que *R. mangle* habita. Para a validação dos resultados do sequenciamento e das análises de bioinformática, 11 genes diferencialmente expressos foram selecionados para validação em RT-PCR (PCR em tempo real), confirmando os resultados de análise de abundância de reads do RSEM.

Palavras-chave: MCG (mudanças climáticas globais), transcriptoma, adaptação, mangue, *Rhizophora mangle*

## ABSTRACT

Mangroves are extremely important ecosystems in terms of aquatic and terrestrial biodiversity, with peculiarities in terms of the characteristics and composition of their habitats, being considered an extreme environment for the survival of vascular plants. In the Brazilian littoral, the arboreal composition of the mangroves is restricted to only six species evolutionarily adapted to the functional complexity of these ecosystems. *Rhizophora mangle* is one of the most abundant species of this ecosystem on the Atlantic coast of the American coast. Studies with neutral microsatellite markers in the species pointed to a strong population structure that divides the species into two large groups in Brazil: one to the north and one to the south of Rio Grande do Norte. The genomic study of *R. mangle* can provide an addition to existing information on mechanisms that influence the distribution of diversity and the adaptive responses of this plant to the environment it occupies. Although the importance of mangroves in the geomorphic stability of the coastline, the preservation of biodiversity and the maintenance of their ecosystem services are well known, these ecosystems are constantly threatened by anthropic actions and global climate change (GCM). The adaptability and regeneration capacity of the true mangrove species in the face of disturbances and changes in environmental conditions is dependent, in addition to the physical and environmental characteristics of each mangrove environment, of phenotypic and genotypic adaptations in response to environmental conditions. This project proposes the sequencing of the transcriptome and elaboration of the gene expression profile of individuals that characterize natural populations of *R. mangle* in the extreme south and north of its occurrence in the Brazilian coast. This study aims to understand how different selective pressures associated to MCGs can affect the patterns and levels of gene expression in natural populations of *R. mangle*, allowing the elaboration of better strategies for conservation and management of *R. mangle* genetic resources and their habitats.

Using the sequencing data by the *R. mangle* RNA-seq technique, new assemblies were tested with three assembly software, CLC, Trinity and Mira. The final assembly of the transcriptome was generated from the union between the assembly generated by Mira and Trinity, keeping the common transcripts and hybridizing the unique transcripts of each assembly. In this way, it was possible to obtain better assembly metrics. A total of 50,379,733 paired-end reads were used for reassembly of *R. mangle* in 72,054 unigenes with a N50 of 1350 bp. A total of 34% of contigs / unigenes were annotated in the Swiss-Prot database and 43.86% of contigs / unigenes annotated in the National Center for

Biotechnology Information (NCBI) Non-Redundant Protein Database (NR). A total of 22,669 ORFs were identified in *R. mangle* transcripts and a total of 18,888 contigs provided information on domains and families of protein sequences identified by the InterProScan tool. We also identified 11,751 single sequence repeats (SSRs) and 46,508 SNPs in the alignment of the reads of the Santa Catarina samples and 87,813 SNPs in the reads of the Pará samples. Among the SNP variants detected, 20,741 were common between both populations. Through the functional annotation by terms of gene ontology (GO), we identified 159 terms in "response to stress", which may be associated with the osteous environment that *R. mangle* inhabits. For the validation of sequencing results and bioinformatics analyzes, 11 differentially expressed genes were selected for validation in RT-PCR (real-time PCR), confirming the results of analysis of abundance of RSEM reads.

Key-words: GCM (global climate change), transcriptome, adaptation, mangrove, *Rhizophora mangle*

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.	<i>Ecossistemas manguezais e sua distribuição ao longo da costa brasileira .....</i>	<i>15</i>
2.2.	<i>Mudanças climáticas e sua ameaça aos Mangues .....</i>	<i>16</i>
2.3.	<i>Aspectos biológicos de Rhizophora mangle.....</i>	<i>18</i>
2.4.	<i>Análise de transcriptoma .....</i>	<i>19</i>
2.5.	<i>Bioinformática .....</i>	<i>22</i>
2.6.	<i>Genes de adaptação.....</i>	<i>26</i>
3.	OBJETIVOS.....	28
3.1.	<i>Objetivo Geral .....</i>	<i>28</i>
3.2.	<i>Objetivos Específicos .....</i>	<i>28</i>
4.	ARTIGO CIENTÍFICO .....	30
5.	RESULTADOS ADICIONAIS .....	76
5.1.	<i>Extração de RNA.....</i>	<i>76</i>
5.2.	<i>Construção das Bibliotecas de cDNA .....</i>	<i>78</i>
5.3.	<i>Sequenciamento Automático .....</i>	<i>81</i>
5.4.	<i>Trimagem das sequências obtidas.....</i>	<i>81</i>
5.5.	<i>Enriquecimento dos Genes únicos em cada população: .....</i>	<i>82</i>
5.6.	<i>Enriquecimento Rede .....</i>	<i>85</i>
6.	CONCLUSÕES .....	101
7.	PERSPECTIVAS.....	102
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
9.	ANEXOS.....	114
9.1.	<i>Anexo 1: Declaração de Biossegurança.....</i>	<i>114</i>
9.2.	<i>Anexo 2: Declaração Referente a Direitos Autorais.....</i>	<i>115</i>

## 1. INTRODUÇÃO

Em um cenário de altas e rápidas taxas de perda dos manguezais (FAO, 2003), é cada vez mais necessário o investimento e esforços para identificar e prever potenciais respostas das espécies de mangue às mudanças climáticas globais em escala local.

A continuidade da prestação dos serviços ecossistêmicos no manguezal e a conservação da sua biodiversidade é dependente da capacidade de adaptação de suas espécies às taxas de alterações no nível do mar, temperaturas atmosférica, águas superficiais, regime de pluviosidade, entre outros fenômenos associados às mudanças climáticas globais (MCG), projetados para o fim deste século. Algumas consequências das MCG que podem ser mensuradas são: mudanças da distribuição dos variantes genéticos no espaço e no tempo (deslocamento ou extinção); alterações nos níveis de plasticidade fenotípica nas populações, em resposta aos novos estímulos ambientais; adaptação evolutiva às novas condições ambientais (Pauls et al., 2013).

A relação entre as mudanças físico-ambientais e estabilidade do habitat mediada por sua composição vegetal é particularmente vital, já que esta determina se as florestas de mangue irão conseguir se manter frente às mudanças futuras de temperatura, regime de pluviosidade e nível do mar. A elevação do nível do mar é uma preocupação especial para os ambientes manguezais uma vez que muitas das suas áreas são incapazes de migrar para o interior por causa das barreiras naturais e artificiais (Krauss, et. al., 2013).

*Rhizophora* e *Avicennia* são os únicos gêneros de mangue que ocorrem por toda a distribuição de manguezais do mundo. *Rhizophora mangle*, dentre as três espécies do gênero no Brasil, tem ocorrência desde o extremo norte de distribuição de mangue no país (Amapá), até o extremo sul (Florianópolis). O estudo genômico de *R. mangle* pode gerar informações importantes sobre os mecanismos específicos que influenciam sobre a dinâmica e as respostas adaptativas desta planta ao ambiente que ocupam. Utilizando os dados de estruturação e diversidade genéticas já existentes em estudos com marcadores microssatélites de *R. mangle* (Pil et al., 2011, Cerón-Souza et al., 2012, Oliveira et al., 2013, Rosero et al., 2002, Arbela'ez et al., 2007, Takayama, et al., 2008) e dados do perfil do transcriptoma de *R. mangle* descrito por Dassanayake et al. (2009), torna-se interessante dedicar atenção ao papel da seleção

natural e à inferência de possíveis adaptações históricas e futuras das árvores de mangue frente às MCG.

A realização do sequenciamento do transcriptoma de *R. mangle* permite o desenvolvimento e aprimoramento do conhecimento sobre a espécie e suas respostas de seleção diante das condições a que estão expostas. Neste contexto de aquecimento global, é importante ressaltar que as possíveis diferenças nas respostas seletivas da espécie podem fornecer subsídios para inferências sobre o nível de ameaça que as mudanças climáticas representam para a ocorrência da espécie em diferentes regiões do país.

A descrição do perfil de expressão gênica de *R. mangle* e das respostas específicas de população geograficamente distintas, de acordo com as diferentes condições ambientais nos extremos latitudinais e com as diferenças genéticas neutras que já foram encontradas entre as populações amostradas, permite a elaboração de questões com enfoque nos caracteres sob seleção. Os resultados desta investigação, além de trazer novas informações sobre a evolução de *R. mangle*, possibilita a definição de melhores estratégias para o acompanhamento do patrimônio genético da espécie, tanto para sua conservação quanto para o manejo dos seus recursos genéticos.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Ecossistemas manguezais e sua distribuição ao longo da costa brasileira

Os manguezais são ecossistemas extremamente importantes em termos de biodiversidade aquática e terrestre ocupando regiões costeiras tropicais e subtropicais de todo o mundo. Estes ecossistemas existem há cerca de 60 milhões de anos, desenvolvendo-se de acordo com as interações continente-oceano e tendo as variáveis que controlam a geomorfologia costeira como determinantes da sua expansão (Ferreira et al., 2007, Lara e Cohen, 2009). No Brasil, sua extensão varia de 10 mil a 25 mil km<sup>2</sup> entre o litoral norte do país e o limite sul do Estado de Santa Catarina, compreendendo uma das maiores áreas de manguezais do mundo (Schaeffer-Novelli et al., 1990).

Tendo em vista a vasta extensão e as variações fisiográficas da costa brasileira, há uma considerável diversidade regional nos ecossistemas manguezais ao longo do país, podendo se distinguir oito unidades físico-ambientais, com condições fisiográficas e processos ambientais distintos. Dentre as 37 eco regiões de manguezais classificadas como altamente relevantes para a conservação na América Latina e Caribe (ALC), sete estão representados no Brasil (Dinerstein et al., 1995).

Além da composição fisiográfica distinta, os manguezais possuem uma cobertura vegetal típica. São ecossistemas com características e composições específicas em seus habitats, sendo considerados ambientes extremos (Inane et al., 2004) por constituir um sistema costeiro com substrato periodicamente inundado pelas marés, com grandes variações de salinidade e baixa concentração de oxigênio do substrato lamoso. A composição arbórea (angiospermas) dos manguezais no Brasil é restrita a apenas seis espécies verdadeiras de mangue (de acordo com a definição de Tomlinson, 1986), pertencentes a três gêneros (*Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia*).

A ocorrência não uniforme das espécies verdadeiras de mangue no Brasil e a localização biogeográfica dos mangues ao longo da costa brasileira refletem históricos distintos de expansão (Menezes et al., 2008). Apesar de as seis espécies arbóreas exclusivas de mangue serem evolutivamente adaptadas à complexidade funcional desses ecossistemas, as adaptações estruturais das espécies em resposta às condições ambientais restritas não possuem um padrão fisiológico (Dassanayake et al., 2009; Twilley, 1995).

Ressalta-se que a capacidade de adaptação e regeneração das espécies de manguezais face às perturbações e mudanças nas condições ambientais é dependente, além das características físicoambientais de cada ambiente de manguezal, das taxas de colonização, dispersão local e de longa distância (em escalas de muitos quilômetros) e da diversidade genética encontrada dentro e entre as populações (Cerón-Souza et al., 2010).

Adicionalmente, fatores como condições de fluxo de água, ação das marés e condições das correntes marítimas (mar aberto ou estuários isolados) influenciam de maneira direta na dispersão de propágulos das espécies de mangue, possibilitando dispersões em longa distância e ocorrência de fluxo gênico entre populações localizadas em regiões geográficas distantes (Nettel et al., 2007).

Atualmente, o crescimento da população humana, a ocupação desordenada dos territórios costeiros e o ritmo acelerado de mudanças climáticas globais (MCG) são processos que tornam os ecossistemas manguezais alvos de grande destruição, sendo considerado atualmente um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta (Duke et al., 2007, Beaumont, 2011).

Neste contexto, a perda destes habitats de alta produtividade biológica tem como consequência o comprometimento de serviços ecossistêmicos de extrema importância (Valiela et al. 2001, Kathiresan e Rajendran, 2005, Koch et al., 2009), tornando seus recursos naturais escassos e ameaçando a fonte de renda de muitas comunidades costeiras que sobrevivem da pesca, comercialização de mariscos e produtos florestais do mangue (Otinto et al., 2003).

## **1.2. Mudanças climáticas e sua ameaça aos Mangues**

Os manguezais são considerados “engenheiros” da adaptação costeira, uma vez que estão constantemente promovendo a persistência de seu habitat natural em meio às mudanças que os afetam, através de uma grande capacidade de modificar seu meio ambiente (Cheong et al., 2013). Os inúmeros distúrbios antrópicos aos quais os ambientes de mangue estão sujeitos comprometem a estabilidade do habitat e sua resistência ao aumento do nível do mar.

Devido ao grande valor ecológico e ambiental dos manguezais, a legislação brasileira passou a considerar estes ecossistemas como áreas de preservação permanente (Resolução Conama 303/ 02). Apesar dos esforços para sua conservação, os manguezais encontram-se



permanentemente suscetíveis às variações do nível do mar e às mudanças climáticas, estando entre os ecossistemas mais influenciados pelas MCG (Loarie et al., 2009). De tal modo, ambos os fatores podem influenciar diretamente na expansão e desenvolvimento dos manguezais (Gornitz, 1991, Alongi et al., 2000, Cohen et al., 2008, Krauss et al., 2008 , Cohen et al., 2009 e Lara e Cohen, 2009).

Em resposta às consequências do aquecimento global projetadas para o ambiente marinho, os mangues têm a capacidade de migrar de acordo com as mudanças do nível do mar, ajustando suas fronteiras para lugares mais altos (Cohen e Lara, 2003, Pessenda et al., 2012), e as florestas de mangues localizadas nos extremos latitudinais de sua distribuição podem ser favorecidas pelo aumento da temperatura, o que permite sua expansão para maiores latitudes (Gilman et al. 2008). No entanto, a ocupação dessas novas áreas depende da disponibilidade de território e de habitat adequado em áreas mais altas das margens dos rios e em áreas costeiras de maiores latitudes. Deste modo, as mudanças do nível do mar e as mudanças climáticas podem influenciar diretamente na expansão e desenvolvimento dos manguezais, podendo causar uma redução populacional acompanhada de uma redução no pool gênico de suas espécies (Gornitz, 1991, Alongi et al., 2000, Cohen et al., 2008, Krauss et al., 2008, Cohen et al., 2009 e Lara e Cohen, 2009).

Processos hidrológicos, geomorfológicos e climáticos interagem com os fatores biológicos das plantas de mangue e influenciam na capacidade e desempenho dos manguezais em se adaptar ao contexto de um ecossistema em mudança (Krauss et al., 2014). Exemplificando-se, altas temperaturas podem limitar os processos fisiológicos por desnaturação enzimática, causando a morte de tecidos vegetais ou de todo o organismo (Krauss et al. 2008), bem como alterar o balanço de carbono das plantas afetando suas taxas respiratória, fotossintéticas, de crescimento e produtividade vegetal (McDowell 2011, Zhao et al. 2013). As consequências de alterações climáticas aceleradas sobre a fisiologia e a capacidade de resposta adaptativa das populações naturais de mangue são ainda desconhecidas.

As espécies vegetais de mangue apresentam um papel de grande relevância na estrutura das comunidades destes ecossistemas, sendo necessária uma melhor compreensão dos possíveis efeitos das MCG sobre tais populações naturais. Aliando-se as abordagens genética e genômica da conservação às informações ecológicas e ambientais já existentes,

será possível implementar medidas de conservação e manejo eficazes para a preservação dos ecossistemas manguezais.

### 1.3. Aspectos biológicos de *Rhizophora mangle*

Dentre a restrita associação de espécies vegetais aos manguezais brasileiros, *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), conhecida popularmente como mangue vermelho, é uma das principais espécies representantes deste ecossistema, em densidade e distribuição, no hemisfério ocidental.

Tal espécie apresenta uma distribuição ampla pelo planeta, ocorrendo do oeste/leste da África, toda a Ásia e Polinésia Ocidental, à costa Pacífica tropical da América (Tomlinson, 1986; Takayama, et. al., 2013) e tem estado presente na região Neotropical há 40 milhões de anos (Muller e Caratini, 1977; Ellison, 1991; Plaziat, J.C. et al., 2001; Graham, A. 2006). Sua ocorrência no Brasil se dá ao longo de toda a distribuição de manguezal do país, desde o norte, no Amapá, ao sul, em Santa Catarina.

*Rhizophora mangle* é encontrada em maior quantidade nas regiões mais próximas à foz de rios, sob um maior grau de inundação pela maré, onde o solo possui maior sedimentação de lama e concentração de sal. Devido à sua localização em porções de solo pouco consolidado dentro do zoneamento estuário, essa espécie apresenta características que permitem a sua sobrevivência e desenvolvimento, tais como maior sustentação através de raízes-escora, dispersão por propágulos e exclusão de sal pelas raízes (espécie filtradora). As membranas celulares atuam como filtros que excluem íons de sal quando a água é succionada pela pressão negativa no xilema (desenvolvida graças à transpiração das folhas) (Maia *et al.*, 2006; Tomlinson, 1986).

O sistema de cruzamento de *R. mangle* é misto, no entanto existem indícios de que a polinização cruzada seja mais frequente que a autopolinização. É uma espécie vivípara cujos propágulos são grandes e curvos sendo dispersos por flutuação na água até se estabelecerem, caso encontrem um ambiente com condições adequadas. A polinização da espécie é por anemofilia (pelo vento) e por entomofilia (insetos) (Menezes et al., 1997).

A dispersão dos propágulos de *R. mangle* pode se dar por longas distâncias uma vez que estes possuem maior longevidade quando comparados àqueles de outros gêneros presentes no mangue. Também apresentam maior taxa de sucesso de germinação de suas sementes quando comparada a outras espécies da família Rhizophoraceae (Rabinowitz, D.,

1978; Steele, O.C., 2006; Takayama et al., 2013). A maior longevidade dos propágulos, combinada com a síndrome de polinização entomofílica sugere uma grande possibilidade de sucesso no estabelecimento de *R. mangle* a longas distâncias, aumentando a possibilidade da ocorrência de fluxo gênico entre populações distantes (Cerón-Souza et al., 2012; Takayama et al., 2013).

A ocorrência densa e contínua ao longo da costa das atuais populações de *R. mangle* pode ser explicada pela hipótese de que as populações de mangue são constituídas por relíquias de ancestrais e que, depois das flutuações do nível do mar no Pleistoceno-Holoceno, a composição do mangue passou a ser dominada por comunidades de *R. mangle* resultante de sua forma mais eficiente de colonização (Pil et al. 2011; Sandoval-Castro, E., 2012).

#### **1.4. Análise de transcriptoma**

Há uma carência de estudos genômicos sobre espécies características de manguezais, sendo este tipo de abordagem fundamental para acrescentar informações aos estudos sobre a estrutura e composição deste tipo de floresta/ecossistema.

Estudos geomorfológicos demonstram o importante papel que a salinidade da água, frequência de inundações, dinâmica de fósforo no solo e fósforo nas folhas desempenham na distribuição das espécies de mangue (Mendoza et. al, 2012). Contudo, estudos em nível genômico dessas espécies auxiliariam a compreender os efeitos que essas e outras variáveis abióticas exercem sobre seu crescimento e distribuição.

Um melhor entendimento dos ecossistemas manguezais pode ser obtido através de estudos de biologia comparativa bem como pela associação de dados ecológicos e moleculares destes sistemas extremófilos. Estudos populacionais em plantas do mangue fornecem informações que permitem compreender como os aspectos genéticos e ecológicos podem determinar a dinâmica de suas populações (Dassanayake et al., 2010).

Dentre as poucas espécies de plantas do mangue brasileiro, *Rhizophora mangle* vem sendo alvo de muitos estudos populacionais, de estruturação genética espacial e de seus processos evolutivos. A variabilidade genética de *R. mangle* no Brasil já foi analisada em marcadores moleculares neutros SSR (microssatélites nucleares e cloroplastidiais), apontando uma forte estruturação populacional que divide a espécie em dois grandes grupos no Brasil: um ao norte e outro ao sul do Rio Grande do Norte (Pil et al., 2011). Uma estruturação da diversidade genética da espécie também foi observada em um estudo com isoenzimas em

populações do México, demonstrando que as populações que ocorrem nas costas do Atlântico e do Pacífico são geneticamente distintas (Núñez- Farfán et al., 2002).

Em outro estudo, desenvolvido com marcadores microssatélites, realizado em populações de *R. mangle* da Colômbia, foi demonstrada uma estruturação genética nas populações analisadas, além de indicar a existência de alta variabilidade genética (Arbeláez-Cortes et al., 2007), o que também foi observado por Takayama et al. (2008), em microssatélites analisados em populações do México e da Costa Rica, e por Sandoval - Castro et al. (2012), em populações da costa oeste do México.

Takayama, et. al., (2013) também apontou diferenciação entre populações de *R. mangle* do Brasil e África ocidental e outras populações da região do Atlântico, recomendando que estas populações sejam consideradas como unidades evolutivamente significativas e unidades de conservação separadas. A diversidade genética entre populações, encontrada através de estudos sobre o fluxo gênico, estruturação genética de populações e filogeografia, auxilia na identificação de unidades genéticas para a conservação e para estudos sobre possíveis diferenciações nas estratégias de sobrevivência (Pil et al., 2011). A definição de unidades de conservação considerando critérios genéticos é muito interessante e pode ser complementada com dados genômicos.

O grupo de pesquisa Genética e Genômica do Laboratório de Análise Genética e Molecular (LAGM/CBMEG/UNICAMP) têm despendido grandes esforços desde 2008 a fim de estudar a distribuição da diversidade genética atual, o passado evolutivo bem como o potencial futuro das espécies verdadeiras de mangue no Brasil. Estudos preliminares realizados até o presente momento, com análises de *loci* neutros através do desenvolvimento de marcadores microssatélites para *R. mangle*, apontam a existência de estruturação populacional, com maior diversidade entre as populações do que dentro de cada população estudada. Foram amostradas populações de 13 municípios, desde o Norte do Pará ao extremo sul de Santa Catarina, sendo o Pará a região onde foi encontrada maior diversidade genética (maior número de alelos distintos), seguida da população do Maranhão e Piauí. As regiões coletadas representam apenas duas populações maiores, sendo uma população ocorrendo do estado do Pará até o Ceará, e outro do estado do Pernambuco até Santa Catarina. Esses resultados sugerem que *R. mangle* do litoral brasileiro não é composta por uma única população panmítica (Oliveira et al., 2013).

Os marcadores neutros em populações de *R. mangle* possibilitam uma melhor compreensão da filogeografia da espécie ao longo da costa brasileira, promovendo informações sobre como eventos históricos ajudaram a formar a atual distribuição de genes e populações, embora os mecanismos de isolamento dessas populações não sejam completamente elucidados (Cerón-Souza et al. 2012).

Uma vez identificada a estruturação genética ao longo da distribuição de *R. mangle* na costa brasileira, o trabalho de análise comparativa entre os perfis de expressão gênica da espécie, em seus extremos de ocorrência no Brasil, podem complementar os estudos de diversidade genética por marcadores neutros.

O entendimento das bases genéticas das adaptações e estratégias de sobrevivência em ambientes de mangue pode ser obtido a partir da abordagem genômica estrutural ou funcional (transcriptomas) de *R. mangle*. A abordagem funcional do genoma, para obtenção de transcriptomas, consiste no estudo do conjunto de RNAs transcritos por um ou vários indivíduos e pode ser utilizado para análise de expressão gênica e, portanto, das funções gênicas. O uso de novas ferramentas moleculares, como o sequenciamento paralelo massivo de RNA (RNA-seq) para espécies do mangue brasileiro apresenta grande relevância para o entendimento das respostas desses organismos ao estresse.

A plasticidade apresentada pelas espécies deste habitat, possibilitada pela diversidade e estrutural e funcional, confere a capacidade de ajustar-se ao meio extremo em que vivem (Cunha-Lignon et al., 2011). Tal abordagem funcional do genoma traz informações complementares aos experimentos científicos clássicos, como os de ecofisiologia, por exemplo, validando as respostas obtidas em ambas as estratégias de investigação ao comparar os estados biológicos e determinar onde as mudanças ocorrem no genoma. A identificação de genes que controlam mecanismos de adaptação ao estresse ambiental em manguezais é de grande utilidade para se entender a dinâmica de sobrevivência das espécies verdadeiras de mangue (Rowan et al., 2011; Oh et al., 2012)

*Rhizophora mangle* é uma das espécie verdadeiras de mangue que já teve seu transcriptoma sequenciado (Dassanayake et al., 2009), iniciando o entendimento do funcionamento dos manguezais através de características genômicas. Recentemente, *Sonneratia alba* e *Avicennia marina* também foram sequenciadas. Apesar de já haver o transcriptoma de *R. mangle* caracterizado por Dassanayake, et. al. (2009), há algumas limitações quanto ao seu uso como transcriptoma referência devido à metodologia utilizada

(pirosequenciamento e sequenciamento Sanger) não ser a mais atual e eficiente em gerar a quantidade de dados necessária para uma análise global do transcriptoma. O número de transcritos obtidos pelo sequenciamento é menor do que os das metodologias atuais de sequenciamento de nova geração, de modo que por questões amostrais de relativamente poucas *reads* terem sido sequenciadas, muitos dados de transcritos importantes podem ter sido perdidos. Portanto sequenciamos, montamos e caracterizamos no presente estudo o transcriptoma de *R. mangle* e analisamos o perfil de expressão gênica de populações naturais do extremo sul e extremo norte do Brasil sob a perspectiva de redes de co-expressão.

### 1.5.Bioinformática

O desenvolvimento da bioinformática e software capazes de montar transcriptomas *de novo* com qualidade, alavancou os trabalhos com RNA-Seq, possibilitando estudos sobre inovações nos mais variados tipos de plantas. A maior parte dos montadores *de novo* são projetados para analisar dados Illumina, tecnologia de sequenciamento que contribui com a maioria dos novos dados de sequência do NCBI, uma vez que o custo por base sequenciada é muito vantajoso frente a outras tecnologias (Honaas et al.,2016).

O método básico utilizado pelos montadores é através de Grafos de Bruijn (Grabherr et al., 2011) e apesar das especificidades de cada software, há uma integração de métricas de qualidade que pode informar sobre o resultado final da montagem. As principais métricas utilizadas são: estatísticas de N50, contagens e contiguidade de UniGene e proporção de leitura de mapeamento. Para fazer uma escolha mais adequada de qual montador utilizar, deve se estimar além da quantidade de UniGenes, os genes específicos para a espécie. É esperado encontrar uma quantidade expressiva de genes conservados, Ultra Conservada ortólogos (UCOs) (Der et al., 2011).

Apesar de haver uma grande variedade de tamanho de transcriptoma entre as espécies de planta, uma representação com 4-5 Gpb é uma boa meta mínima de dados sequenciados para uma reconstituição de um transcriptoma, uma vez que ganhos substanciais são obtidos em incrementos de 1 a 4 Gbp, além desta quantidade, os rendimentos da obtenção de dados adicionais diminuem consideravelmente (Honaas et al.,2016).

Adaptações fisiológicas e moleculares das plantas ao estresse ambiental individual ou múltiplo, envolve mudanças fundamentais na arquitetura “ômica”, seja na conformação estrutural ou comportamental de genes, proteínas e metabolitos. Para entender como existem

plantas capazes ou incapazes de tolerar mudanças climática globais, devemos explorar as pesquisas “ômicas” em conjunto com as abordagens de biologia de sistemas (Ahujal et al., 2010).

A tolerância ao sal e os mecanismos desenvolvidos por plantas de estuários envolvem a expressão de vários genes específicos. Plantas halófitas utilizam antiportadores  $\text{Na}^+ \text{H}^-$  na membrana (SOS1) e proteínas NHX envolvidas no sequestro de sódio ( $\text{Na}^+$ ) em vacúolos para evitar toxicidade de íons no citosol. Outros mecanismos importantes são a modulação vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPases e a  $\text{H}^+$ -pirofosfatase na membrana de plasma, transportadores de potássio, osmólitos, enzimas antioxidantes, glândulas de sal, bexigas, além de vias já definidas como comunicação cruzada (cross-talk) (Himabindua et al., 2016).

Atualmente, há uma quantidade considerável de dados a respeito de genes ligados a tipos específicos de estresse, sendo que os eventos de estresse, dificilmente ocorrem de maneira exclusiva (Figura 1). Desta forma, há uma grande necessidade para as atuais e futuras pesquisas, a realização de abordagens de biologia de sistemas para estudar as respostas das plantas a pressões ambientais combinadas, como as geradas pelas mudanças climáticas globais entre outras catástrofes. A fim de gerar modelos preditivos abrangentes para o estudo da aptidão de plantas para a mudança de clima, é preciso compreender a contribuição das diferentes vias de sinalização que definem respostas arquitetônicas “ômica” (Ahuja et al., 2010).

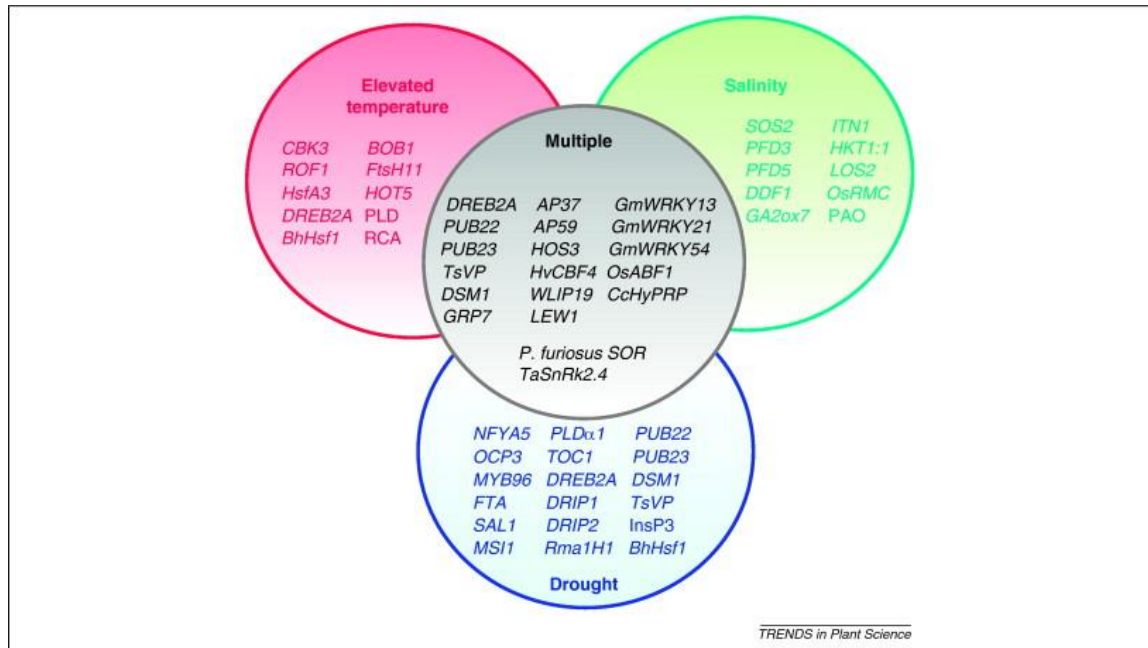


Figura 1: Identificação de genes induzidos por estresse ambiental específico, como salinidade e elevação de temperatura, tal como genes relacionados a mais de um estresse ambiental.

Além da arquitetura “ômica”, os eventos de dispersão dos manguezais são interessantes formas de compreender sobre as atuais formas de adaptação dos seres que habitam estes ecossistemas, tanto quanto a evolução dos mecanismos de adaptação ao estresse, quanto a previsão de como as atuais composições genéticas e genômicas destas espécies podem contribuir ou não para a persistência delas em seus habitats. Eventos glaciais no Pleistoceno, por exemplo, que afetaram os níveis de mar e do clima provavelmente são responsáveis por modificações na distribuição dos mangues presentes em diferentes regiões do mundo (Luther & Greenberg, 2009).

As condições geográficas e climáticas influenciam sobre a dispersão dos manguezais, porém estas condições não são constantes, o que dificulta a compreensão das mudanças populacionais de mangue. O aquecimento global no período Eoceno contribuiu para mudanças em grande escala da circulação no fundo oceânico, determinando as grandes correntes oceânicas de hoje (Lyle et al., 2008). Estas correntes oceânicas desempenham um papel fundamental na formação da distribuição e conectividade de organismos marinhos (York et al., 2008). Outros fatores também devem ser levados em conta no estabelecimento subsequente após os eventos de dispersão são as correntes de vento, assim como a adaptação ao habitat para subsequente estabelecimento, após cada evento de dispersão.

O aquecimento global exerce uma forte influência sobre a temperatura média global e níveis de precipitação, que são os principais fatores climáticos conhecidos por limitar a



distribuição geográfica de mangue. Os manguezais mais prolíficos têm suas ocorrências restritas a latitudes tropicais e temperadas em regiões de alta precipitação (Duke et al., 1998). Como as condições climáticas do Sul e do Norte do Brasil são diferentes, ainda são pouco conhecidos e estimados os efeitos das mudanças climáticas sobre os seus manguezais, assim como os efeitos sobre as populações de *Rhizophora mangle*. A probabilidade de extinções locais poderia diferir muito entre estas regiões geográficas, dependendo de como a espécie pode expandir e/ou contrair em suas distribuições em resposta às mudanças climáticas.

Uma combinação de eventos de vicariância (como a deriva continental) e dispersão limitada pela direção de correntes oceânicas criaram uma barreira ao fluxo gênico e, portanto, facilitaram a divergência populacional ou especiação alopática entre o gênero *Rhizophora*, o gênero dominante da família de mangue mais difundida, Rhizophoraceae. Essa combinação de eventos pode explicar a divergência histórica e os atuais padrões biogeográficos da ocorrência global de *Rhizophora* (Lo et al., 2014).

A disjunção na distribuição das espécies de *Rhizophora* é demonstrada pelo mapa da Figura 2, onde são descritas duas grandes regiões: Indo West Pacific (IWP) e Atlantic East Pacific (AEP) (Duke et al., 2002). As populações de *Rhizophora* não são morfologicamente uniformes e contínuas no nível intra-específico (Cerón-Souza et al., 2010).

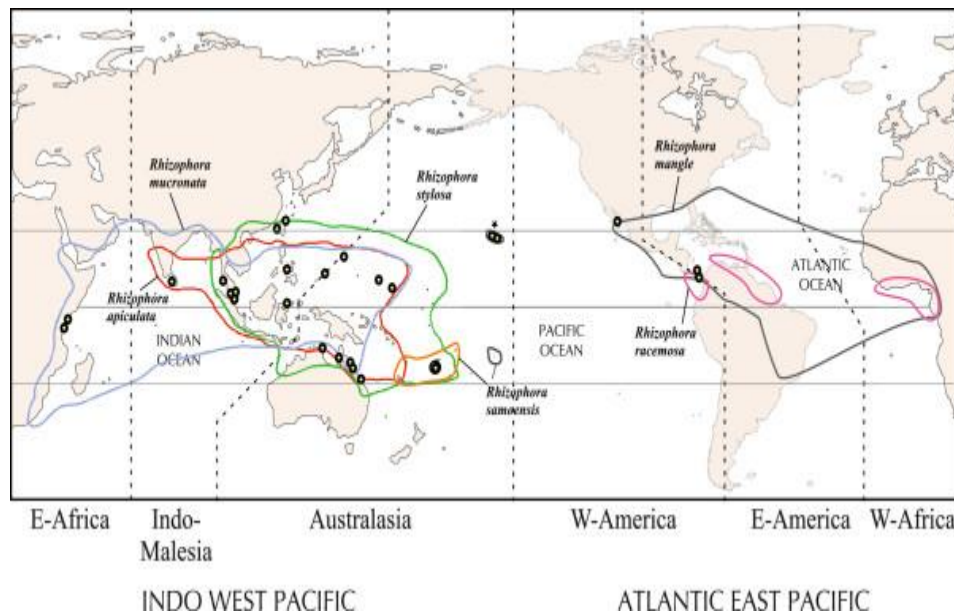


Figura 2: Mapa com a descrição da ocorrência de espécies de *Rhizophora* pelo mundo, dividida em duas grandes regiões: Indo West Pacific (IWP) e Atlantic East Pacific (AEP) (Lo et al., 2014).

A notável capacidade de dispersão a longa distância do gênero *Rhizophora* é proporcionada pelos seus propágulos flutuantes em água. Esta característica, por exemplo, contribuiu para a dispersão e rápida evolução de *Rhizophora mangle* por mais de 3.000 milhas do norte ao sul da costa brasileira desde o fim do último período glacial (Pil et al., 2011). Dentro de cada região IWP e AEP houve uma longa história independentes dos movimentos tectônicos e relativamente mais recente, dispersões de longa distância em IWP (Lo et al., 2014).

Apenas seis das espécies difundidas de *Rhizophora* pelo mundo são descritas *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora mucronata* e *Rhizophora stylosa* na IWP; *Rhizophora mangle* e *Rhizophora racemosa* na AEP; e *Rhizophora samoensis*, a única espécie encontrada naturalmente em ambas as regiões (Duke et al., 2002).

### **1.6. Genes de adaptação**

A redução dos limites de áreas de ecossistemas manguezais que vem ocorrendo devido ao aumento das populações humanas e outros estresses abióticos, tais como secas, temperaturas extremas e mudança na frequência de inundações (decorrente do aumento do nível do mar). Vem aumentando o interesse sobre quais são os mecanismos de resposta ao estresse dos organismos que compõem a biodiversidade deste habitat (Parida e Jha, 2010, Rajaravindran e Natarajan, 2012 e Zhu et al., 2012). Além das variáveis morfológicas associadas com a capacidade de manguezais em sobreviver a condições adversas, tais como raízes aéreas, folhas suculentas, mecanismos de exclusão de sal e viviparidade (Duke, 2006 & Tan et al., 2013), as plantas de mangue também evoluíram outras adaptações fisiológicas e bioquímicas para alta salinidade, tais como: acumulação e absorção de compostos de baixo peso molecular (Zhu et al., 2011), ultra filtração por raízes (Parida e Jha, 2010), regulação osmótica (Zheng e Lin, 1998 e Lu et al., 2013) e regulação do sistema antioxidante (Wang et al., 2013).

O conhecimento sobre os recursos genéticos de plantas do mangue, capazes de crescer em condições de alta salinidade, hipóxia, solo constantemente alagado e sob altos índices de radiação ultravioleta, pode fornecer a identificação de um conjunto de genes que são exclusivamente expressos em resposta ao estresse abiótico. A tolerância a condições extremas ambientais também é atribuída à regulação de redes de interações gênicas. Tais redes serão

melhor compreendidas utilizando ferramentas de genômica funcional, que possibilitam a descrição e a caracterização de genes envolvidos na tolerância das plantas de mangue às suas condições inóspitas (Radwan, 2015).

Algumas espécies de mangue tiveram seu transcriptoma sequenciado nos últimos anos, como *Rhizophora mangle* e *Heritiera littoralis* (Dassanayake et al., 2009), *Sonneratia alba* (Chen et al., 2011), *Millettia pinnata* (Huang et al., 2012), *Avicennia marina* (Huang et al., 2014), *Ceriops tagal* (Liang et al., 2012) e *Ceriops tagal* e *Ceriops zippeliana* (Yang et al., 2015). Em *C. tagal*, o transcriptoma revelou que a regulação transcricional desempenha um papel importante na resposta ao estresse salino.

Estudos específicos em plantas lenhosas de mangue relatam as consequências da alta salinidade que podem perturbar o metabolismo, por meio de danos oxidativos a proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Ksouri et al., 2007). O estresse por excesso de sal pode provocar a acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) citotóxicas. Em contrapartida, plantas de mangue desenvolveram um sistema antioxidante eficaz, incluindo antioxidantes de baixo peso molecular além de outros tipos de antioxidantes, tais como: ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis (Rajaravindran e Natarajan, 2012 e Zhu et al., 2012). *A. corniculatum* e *Kandelia candel* sob tratamento de sal, mostraram respostas de enzimas relacionadas com antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX), e catalase (CAT), para remover os radicais livres (Chen et al., 2013; Mishra e Das, 2003; Wang et al., 2014). O sistema antioxidante regulado por NO (óxido nítrico) também é um importante mecanismo de tolerância à salinidade em plantas de mangue (Chen et al., 2014).

Diversos estudos trazem informações sobre consequências do estresse abiótico sobre a sobrevivência de plantas. O estresse hídrico, por exemplo, pode reduzir o rendimento médio de uma planta em mais de 50% (Boyer, J.S. & Westgate, 2004); inibe o crescimento das plantas, aumenta a atividade e reduz o rendimento de enzimas antioxidantes; aumenta a concentração de osmólitos na planta (Kosturkova, et al., 2008); reduz a taxa de fotossíntese, suprime a síntese de clorofila, diminui a atividade de enzimas fotossintéticas (Bhattacharjee, S. & Saha, A., 2014), além de ocasionar a redução da divisão celular (Marshall et al., 2012).

Apesar do grande potencial para descoberta de genes de resposta ao estresse ambiental, ainda há relativamente poucas informações de transcriptomas de espécies manguezais. *Avicennia marina* vem sendo uma das plantas de mangue mais estudada por ser uma planta halófila que suporta uma elevada salinidade (até NaCl 600 mM), tolerância esta, associada a

sua eficiência no uso da água, que equilibra o ganho de carbono, a perda de água e absorção de íons, mantendo a transpiração e o fluxo destas moléculas em um nível baixo, mas constante (Chen et al., 2010).

Outro mecanismo que vem sendo estudado em plantas de mangue é o de resposta ao frio, tal como seus fatores de transcrição (Lin et al., 1994; Quisthoudt et al., 2012; Peng et al., 2015). Peng et al.(2015) sugere que o gene AcCBF1 (100% de identidade com AmCBF1 de *Avicennia marina*) pode exercer um papel importante na via de sinalização de frio e estresse por seca em *Aegiceras corniculatum*.

No mangue-amarelo, *Ceriops tagal* e *Ceriops zippeliana*, e numa espécie considerada parente terrestre do gênero *Ceriops*, *Pellacalyx yunnanensis*, a classificação por ontologia (GO) revelou perfis de transcriptoma semelhantes para as três espécies (Yang et al., 2015), de modo que tais genes podem ser estudados para conhecer se a origem e a evolução adaptativa destas espécies está ligado à características específicas de habitats manguezais.

Há uma falta de recursos genômicos e de transcriptoma para a pesquisa genômica em manguezais pois, apesar do conhecimento sobre a importância ecológica do mangue ainda são indefinidos quais são os mecanismos moleculares subjacentes à sua adaptação para sobreviver em tais condições. Plantas de mangue com tolerância à salinidade elevada entre outros estresses abióticos representam um reservatório de muitos novos genes e proteínas relacionadas à tolerância, que necessitam ser identificados e estudados com maior profundidade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.Objetivo Geral**

Realizar uma análise global dos transcritos de *R. mangle* em indivíduos provenientes de populações naturais geneticamente e geograficamente distintas, gerando também um amplo transcriptoma de referência para a espécie.

### **2.2.Objetivos Específicos**

- Montagem *de novo* de um transcriptoma global de *Rhizophora mangle*;
- Identificação de transcritos Diferencialmente Expressos entre os indivíduos das duas populações estudadas;
- Anotação funcional dos transcritos montados;
- Identificação de redes de correlação de expressão gênica tecido-específicas;
- Identificação de categorias funcionais enriquecidas em diferentes conjuntos de transcritos;
- Identificar os genes que possivelmente estejam ligados às pressões seletivas características das condições ambientais locais.
- Investigar os transcritos possivelmente associados com respostas adaptativas às discrepantes condições climáticas às quais as populações estudadas estão expostas;
- Relacionar resultados encontrados com as perspectivas evolutivas da espécie frente aos cenários de mudança climática previstos para o fim deste século (conforme sugerem as previsões de aquecimento pelo IPCC 2013).

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

**Adaptations to extremophilic trees within climate change scenarios: co-expression network in *Rhizophora mangle***

Stephanie Karenina Bajay<sup>1</sup>, Mariana Vargas Cruz<sup>1</sup>, Carla Cristina da Silva<sup>1</sup>, Natália Faraj Murad<sup>1</sup>, Marcelo Mendes Brandão<sup>1</sup>, Anete Pereira de Souza<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

**Corresponding author:** Stephanie Karenina Bajay [bajay.sk@gmail.com](mailto:bajay.sk@gmail.com) +55 19 981710104; Mariana Vargas Cruz [marivargascruz@gmail.com](mailto:marivargascruz@gmail.com) +55 19 999279911; Carla Cristina da Silva [silvacbio@yahoo.com.br](mailto:silvacbio@yahoo.com.br) +55 19; Natália Faraj Murad [nataliafmurad@gmail.com](mailto:nataliafmurad@gmail.com) +55 19 , Marcelo Mendes Brandão [brnadaom@unicamp.br](mailto:brnadaom@unicamp.br) +55 1935211118, Anete Pereira de Souza [anete@unicamp.br](mailto:anete@unicamp.br) +55 19 3521-1132

## Summary

✓ The goal of this research was to generate a *Rhizophora mangle* transcriptome to better understand the capacity of adaptation and regeneration of this true mangrove species in the face of historical and future perturbations and climatic changes (as predicted by IPCC 2014 forecasts).

✓ RNA sequencing data were generated for three individuals from the northern end of the species occurrence in Brazil (Pará state) and for three individuals located at the southern end (Santa Catarina state). A global assemblage was performed using 317,117,092 reads from five tissues: root, leaf, meristem, flower and stem.

✓ The inhospitable survival conditions of *R. mangle* provide numerous responses that may inform adaptations to environments with high salinity, constant flooding, low soil oxygen content, and other stress conditions. Exploring these responses as a whole can provide insight into the genomic response to environmental change. In this broad perspective of the need to adapt to climate change, many native plants and cultures share the need to increase tolerance to stressors. This tolerance is very important for the survival of many species and for increasing the yields of commercial crops.

**Keywords:** adaptation, climate change, co-expressed networks, differential expression, mangrove, *Rhizophora mangle*, transcriptome,

## Introduction

Gradual global warming is unequivocal and evidenced by periodic measurements of air and ocean temperatures (IPCC, 2014). The climate projections published in the 5<sup>th</sup> Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) are marked by high temperature and by the intensification of both rainfall and severe droughts. An increased frequency of extreme events, such as prolonged droughts, undertows, more intense storms, prolonged rains and high temperature, is expected.

Global forecasts for the period 2081-2100 indicate a 10 to 40% decrease in precipitation for northern South America and an increase of up to 10% for southern South America compared to the reference period 1986-2015. Additionally, an increase in sea salinity of up to 0.5% is predicted throughout Southern America (Collins *et al.*, 2013; IPCC, 2014). Projections made specifically for Brazil based on regional and global measurements indicate a warming of 3 °C by the end of this century, a 30% increase in rainfall in the South-Southeastern region and a 40% decrease in rainfall in the North-Northeastern region (Debortoli *et al.*, 2017).

Brazilian marine ecoregions are areas with distinct suites of oceanographic or topographic characteristics. These systems have been strongly influenced by climate change during the last four decades, and similar increases in temperature were observed for all ecoregions. However, seasonal rainfall oscillations varied among regions. Precipitation was highly seasonal in the tropical region; it varied more than 400 mm between rainy periods and had lower peaks on the Southern coast where changes in rainfall volume were less than 88 mm. There was a significant trend of increased rainfall in the Southeastern ecoregion of Brazil that was probably due to the increased summer rainfall over the last two decades (Bernardino *et al.*, 2015).

Increases in the sea level and in the frequency of intense droughts at the Northern and Southern ends of the Brazilian coast are predicted. These regions, particularly the Amazon River Basin, are considered hotspots of exposure to natural hazards (de Almeida *et al.*, 2016). As a consequence of increased temperature in river basins and estuarine areas, significant changes in hydrology (evaporation, streamflow and estuarine mixing of sea and river) are expected and will lead to more complex effects on ecosystem dynamics (Gillanders & Kingsford, 2003; Day *et al.*, 2008).

Changes in temperature and sea level may also interfere with salinity and can consequently affect many estuarine habitats, including the seabed and mangrove forests (Short & Neckles, 1999; Alongi, 2008; Dolbeth *et al.*, 2011). Increased rainfall and sea levels in Southern Brazil are expected to modify the salinity equilibrium due to increased evaporation and inflow of marine water. Along the



Northern coast, salinity may increase due to higher temperatures and diminished river flow (Milliman *et al.*, 2008).

Changes in the tidal regime, salinity and hydrology can lead to changes in the structural development and distribution of estuarine species (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2002; Cunha-Lignon *et al.*, 2011). Although climate change can be subtle and difficult to spot, it is expected to greatly affect coastal species at rates that may be faster than those required for population adaptation. The identification of vulnerabilities and factors that increase or decrease the resilience of these species is relevant for conservation planning and management in the context of climate change (Mitsch *et al.*, 2013).

Predictions about the potential impacts of climate change on coastal zones have drawn great attention due to the threat to mangrove ecosystems (Ellison, 2015). Mangroves are more likely to respond to increased air and water temperatures, increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentration, changes in river flow and water quality, and changes in the frequency and intensity of extreme weather events due to the location of mangroves at the continent-ocean interface (Alongi, 2008; McKee *et al.*, 2012). These factors will, to a certain extent, change the primary and secondary productivity and respiration of mangroves and their associated biocenoses, as well as the transport of materials to adjacent terrestrial and marine ecosystems.

Mangroves are ideal ecosystems for monitoring the impacts of global climate on vegetation because they are constantly promoting the persistence of their natural habitat amid the changes that affect them (Cheong *et al.*, 2013). Mangrove forests are permanently susceptible to variations in sea level (Woodroffe, 1990; McKee *et al.*, 2007) and climate change (Alongi, 2008; McKee & Rooth, 2008; Semeniuk, 2013). They are among the ecosystems most influenced by global climate change (Loarie *et al.*, 2009). Fluctuating sea levels, precipitation and temperature regimes have influenced global mangrove distributions since geological times in the Holocene (Sherrod & McMillan, 1985; Ellison *et al.*, 1999). Mangroves have the ability to migrate according to sea level changes and can move their boundaries to higher latitudes (Cohen & Lara, 2003; Pessenda *et al.*, 2012), where they flourish due to the increased temperature (Gilman *et al.*, 2008).

Therefore, changes in sea level and climate change can directly influence the expansion and development of mangroves and lead to population reduction accompanied by the reduction of the species' gene pools (Alongi *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2008; Krauss *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009; Lara & Cohen, 2009). However, the changes to mangroves and their systemic attributes must be carefully interpreted considering local environmental disturbance regimes and pressures. The potential for adaptation and survival of a species depends on the physiology, resilience and ability of the species to withstand changes at the local and regional levels (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2016).

Other than being environmental indicators of response to climate change, mangroves can be an important part of climate adaptation strategies in wetlands because they capture large amounts of carbon from the atmosphere. Local hydrodynamic and geomorphic forces provide effective means to sequester carbon in situ or export carbon to the marine carbon cycle (Mitsch *et al.*, 2013). Both the aerial (leaves and wood) and underground parts of the plants are carbon sinks. The extensive areas of mangroves in Brazil can play an important role in offsetting industrial greenhouse gas emissions. The degradation of these areas could jeopardize Brazil's desired emission reduction targets (Donato *et al.*, 2011).

Brazilian mangroves are under threat from extremely destructive anthropic processes in addition to exposure to climate change. These anthropic processes include large-scale port development, shrimp farming and urban growth; narrow coastal habitats; and limit the ability of mangroves populations to adjust to new environmental challenges (Duke *et al.*, 2007; Beaumont *et al.*, 2011).

Losses of these highly productive habitats threaten the source of income of many coastal communities that survive on fishing and the marketing of shellfish and mangrove forest products (FAO, 2010). Mangrove forests are also an essential component of coastal protection systems by providing protection from very high undertows and tides.

The continuity of the ecosystem services provided by mangroves and the conservation of their biodiversity depend on the ability of mangroves to adapt to the projected rates of increasing sea levels associated with global climate change. Some consequences of the latter that can be measured are changes in the distribution of genetic variants in space and time (displacement or extinction); changes in phenotypic plasticity levels in populations in response to new environmental stimuli; and evolutionary adaptation to new environmental conditions (Eizaguirre & Baltazar-Soares, 2014).

Mangroves are extremely important ecosystems in terms of aquatic and terrestrial biodiversity; they cover 170,600 km<sup>2</sup> of tropical and subtropical coastal regions around the world. These ecosystems have existed for approximately 60 million years; they have developed according to continent-ocean interactions, and the variables that control coastal geomorphology determine mangrove expansion (Cohen & Lara, 2003; Ferreira *et al.*, 2007).

Brazilian mangroves represent the third largest mangrove area in the world in one single country and are spread over an area of 9,600 km<sup>2</sup> (Giri *et al.*, 2011). Given the wide extension and physiogeographic variation of the Brazilian coast, there is considerable regional diversity within mangrove ecosystems; eight physical-environmental units with different physiographic conditions and environmental processes can be identified. Of the 37 mangrove ecosystems classified as highly

relevant to conservation in Latin America and the Caribbean, seven are found in Brazil (Dinerstein *et al.*, 1995).

Mangroves have a typical vegetation coverage in addition to a proper physiographic composition. Mangrove species are considered extremophiles because they inhabit a coastal system with substrates periodically flooded by the tides; these factors cause great salinity variations and a low concentration of oxygen in the muddy substrate (Dassanayake *et al.*, 2009).

The adaptability and regeneration capacity of mangrove species to disturbances and changes in environmental conditions depend on the rates of colonization; local and long-distance dispersion; and the genetic diversity found within and among populations (Ceron-Souza *et al.*, 2010). Water flow conditions, tidal action and sea currents directly influence the dispersal of propagules of mangrove species and allow long-distance dispersal and the occurrence of gene flow among distant populations (Nettel & Dodd, 2007).

Approximately 70 species of mangroves, mainly in Asia and Oceania, are at high risk of extinction and could disappear in the next decade. This potential loss may have devastating economic, environmental and social consequences given the importance of the ecosystem services provided to human populations, especially to those living in coastal areas; these services account for at least US \$1.6 billion per year worldwide (Polidoro *et al.*, 2010).

The tree composition (Angiosperms) of mangroves in Brazil is restricted to only six true mangrove species according to the definition of Tomlinson (1986) that belong to three genera: *Rhizophora*, *Avicennia* and *Laguncularia*. Of these six species, *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), which is popularly known as the red mangrove, is the most commonly found in Brazil and in the Western Hemisphere in terms of density and distribution. After the Pleistocene-Holocene sea level fluctuations, mangrove composition began to become dominated by *R. mangle* due to its efficient form of colonization; this dominance led to this species having a dense and continuous occurrence along the Atlantic coast of the American Continent (Pil *et al.*, 2011; Sandoval-Castro *et al.*, 2012).

Although this tree species, similar to other unique species of mangrove, is adapted to the functional complexity of its ecosystem, it presents unique structural adaptations in response to harsh

environmental conditions. Therefore, *R. mangle* does not present a physiological pattern similar to that of other mangrove species (Dassanayake *et al.*, 2009).

The genetic variability of neutral genomic markers (simple sequence repeats; SSRs) in *R. mangle* is structured into two large population groups in Brazil: one from the state of Pará (PA) in the Northern region to the state of Rio Grande do Norte in the North-eastern region and the other from the latter state to the state of Santa Catarina (SC) in the Southern region of the country (Pil *et al.*, 2011). There is greater genetic diversity between populations than within each population, which suggests that *R. mangle* from the Brazilian coast is not composed of a single panmictic population. The distinguishable allelic composition found in these two populations of *R. mangle* can be explained by the historical colonization of the species in those regions or may be the result of adaptations to local environmental characteristics.

Given the importance of this mangrove species in Brazil, the study of the resilience of these two populations to climate change reveals important features about their adaptations to regional abiotic stresses (Ward *et al.*, 2016). Gene flow, population genetic structure and phylogeographic studies also help to identify genetic conservation units and possible differentiations in survival strategies between populations (Pil *et al.*, 2011). The definition of conservation units considering genetic criteria is very interesting and can be complemented with genomic data.

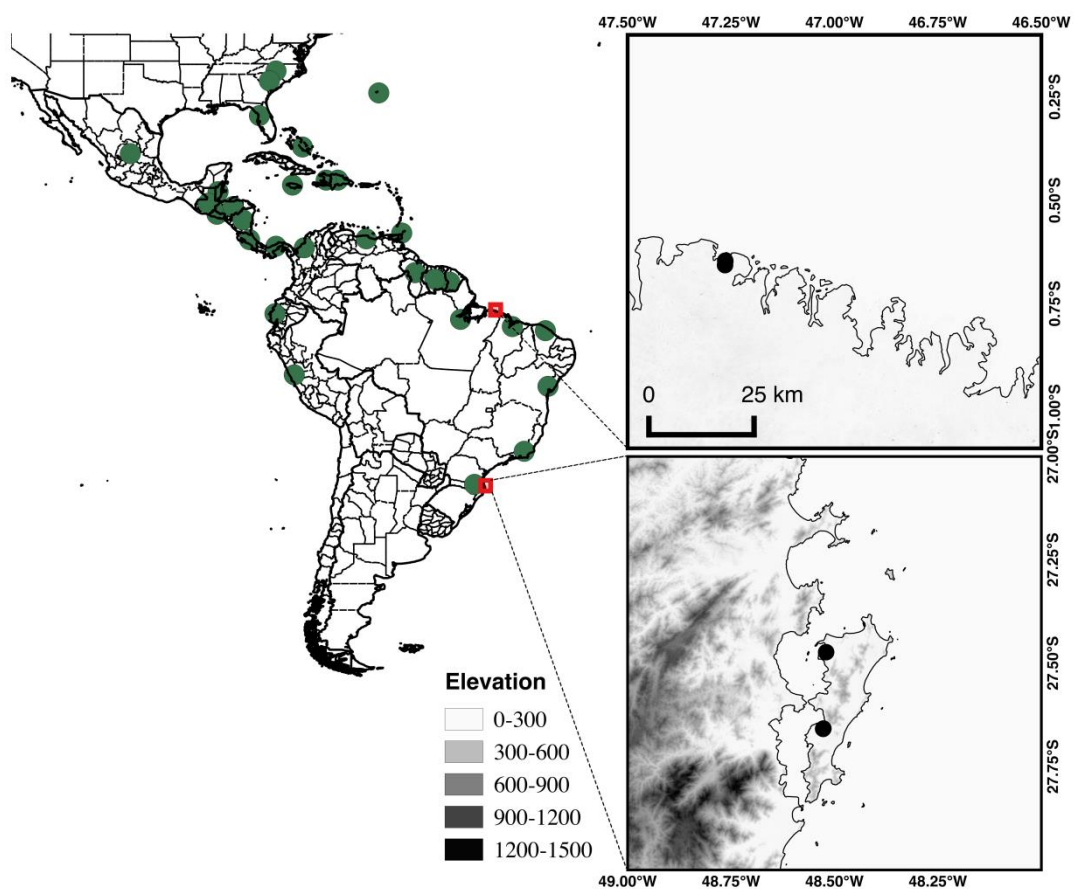
This article presents the *R. mangle* transcriptome to describe the genomic expression from individuals collected from the Northern (state of PA) and Southern (state of SC) ends of the Brazilian coast. Our aim was to improve the genomic knowledge of *R. mangle* to understand its adaptative responses to the environmental conditions to which it is exposed. Natural populations in contrasting latitudes are locally adapted to environmental conditions and have networks of gene interactions that differentiate them into two distinct groups. It is important to emphasize that differences in adaptative responses provide subsidies for inferences about the level of threat from climatic change to the occurrence of the species in each region of the country.

## **Materials and Methods**

### ***Plant materials***

Plant material was collected from six medium-sized adults of *R. mangle* at two contrasting latitudes (Figure 1): samples were collected throughout field expeditions in Salinópolis (State of PA - Brazil), which is the northern limit of the Brazilian coast but center of the distribution of the species along the Atlantic Coast of the American Continent, and Florianópolis (SC-Brazil), which is the

southern-most limit of the species' distribution. The samples from Salinópolis were collected between 26 and 19 June 2014 during the flowering period of the species in the Northern region. In Florianópolis, samples were collected between 20 and 24 August during the beginning of the flowering season in the Southern region. Roots, stems, meristems, flowers and leaves were sampled and immediately stored separately in falcon tubes with an RNA stabilizing solution (RNA<sup>later</sup>, Applied Biosystems / Ambion, Austin, TX, USA) to be further macerated and stored at -80 °C. *Rhizophora mangle* was identified through species-specific floral features. This species is distinguished from the other sympatric species of the genus *Rhizophora* by the presence of only 2-3 flowers on floral branches, while *R. racemosa* and *R. harrisonii* have more flowers per branch (Figure 2)



**Figure 1.** Green dots demonstrate the distribution of *Rhizophora mangle* across America. Red squares represent the sampling sites at both Northern and Southern ends of the Brazilian coast. The latter coincides with the Southernmost point of the occurrence of the species throughout America.



**Figure 2.** (a) mangrove from Florianópolis, where the individuals are more spaced and the rhizophores do not reach one meter in height. (b) Adult trees of *R. mangle* in muddy soil in Pará. The rhizophores reached up to five meters in height. (c) *R. mangle* floral branch collected in Florianópolis, where the axillary inflorescence grouped into branches with two flowers, a characteristic that was used for species identification.

Three individuals were sampled in Salinópolis and three individuals in Florianópolis from areas with very diverse physiognomies in order to characterize a general profile of the occurrence of the plant in all environmental gradients. Sampled trees were located in slightly flooded sandy areas and in muddy areas with severe flooding. Each tree's position was determined and recorded by a GPS receiver (Garmin: GPSMAP 76CS).

#### ***RNA isolation and transcriptome sequencing***

Total RNA was isolated from the roots, stems, leaves, meristems and flowers using the Plant RNA Isolation Mini Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A NanoVue™ device (Spectrophotometers Plus, GE Healthcare) was used to determine RNA purity and concentration. To analyse the integrity of the samples, RNA was subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel; visualization of rRNA bands without traces (indicating degradation or contamination by genomic DNA) showed that the RNA was intact enough to be used in sequencing experiments.

Messenger RNA was purified from total RNA using poly (T) low-adsorption magnetic beads. Purification was interrupted at a high temperature to select its suitable length. Complementary DNA synthesis was continued to obtain dsDNA and for further purification. Finally, the resulting cDNA from roots, stems, flowers, leaves and meristems was used to construct the transcriptome sequence

library. The cDNA library was enriched through PCR and submitted to high-throughput sequencing on an Illumina GAIIx Sequencing Platform.

### ***De novo sequence assembly***

The cDNA library was constructed using two Illumina paired-end TruSeq RNA Library Prep Kits (72 cycles) and sequenced using the Illumina GAIIx sequencer. Raw paired-end 72-bp reads were obtained from raw image data and transformed from base calling into raw sequence data.

Clean data were generated from raw data through data processing, which included the removal of low-quality reads and adapter sequences using the *NGS QC Toolkit* (Patel & Jain, 2012). The clean reads were subjected to *de novo* assembly using Trinity v2.0.2 (Grabherr *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2013) and MIRA 4.0.1 (Chevreux *et al.*, 1999) to assemble longer transcripts. The transcriptome assembly was then conducted by reconstructing the consensus sequence from overlapping transcripts between Mira and the Trinity assemblies using 100% of the similarity assessed through BLASTn (Camacho *et al.*, 2009).

### ***Redundancy filtering***

After assembling the reads into longer contiguous sequences (contigs) and to reduce artefactual redundancy, we predicted the coding sequences of transcripts (CDS) and clustered them using a TransDecoder (Haas *et al.*, 2013). When generating clusters, we used a similarity threshold of 95% and required that 90% of the length of the putatively redundant sequence had to align to the longest sequence using a customized Perl script. We kept only the longest putative CDS sequence per cluster

### ***Annotation of unigenes***

The functional annotation, were indicated by a process using a customized set of perl scripts and local databases build with public available data from the following databases: National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant proteins and nucleotides databases (NR), Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/>), and GO (<http://www.geneontology.org/>). using an e-value cut-off of  $10e^{-5}$  and HSP similarity threshold of 80%. RNA families patterns were indicated by

hmmscan (Eddy, 2011) using RFAM database version 12 (Nawrocki *et al.*, 2015). Protein families patterns from PFAM database (Finn *et al.*, 2014) were proposed by hmmscan using a set of translated peptides from candidate coding regions within the assembled transcriptome sequences indicated by transdecoder (<https://transdecoder.github.io/>). ***Detection of SSR molecular markers and SNPs***

Unigenes larger than 1 Kb were subjected to SSR search using the MISA software (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>).

To detect SNP variants, the CLC Genomics Workbench 6.5.8 software was used to search variants based the quality standard on the Neighbourhood Quality Standard (NQS).

### ***Differential expression of contigs***

Bowtie 2 (Langmead *et al.*, 2009) was used to map the paired-end Illumina reads against the transcriptome and recorded only the best alignment for each reading. The ratio of reads of each sample mapped against the assembly is a useful criterion for evaluating the quality of the *de novo* transcriptome. The mapping was analysed for the number of readings for each assembled sequence, and this count was used for RNA-Seq expression analysis (Mortazavi *et al.*, 2008).

The coverage of each transcriptome gene was determined by mapping through RSEM (Li & Dewey, 2011), using an Expectation-Maximization (EM) algorithm to estimate maximum likelihood expression levels. The differential expression analysis between the Southern and Northern populations was performed by R using an array with EM values in the EBSeq (Anders & Huber, 2010) package, which is indicated for this type of analysis without a genomic reference.

Differential expression analysis was composed of two distinct steps. The first step was the analysis of differential expression between each possible pair of sampled individuals from both studied regions. As the objective of this work was to characterize the response genes to a region, Northern and Southern, the first stage of differential expression was to exclude the differences found between the individuals (genotypes).

The overlapping non-DE transcripts (basing in value of PPDE: posterior probability of being differentially expressed) between each pair of samples within the same location were selected for the following step. A comparison between the subsets of transcripts obtained from the two studied regions led us to divide the dataset into two new sets of transcripts: 1) the overlapping non-DE transcripts between both populations and 2) the non-DE transcripts from each population that were absent from the other population. The selected transcripts were compared to the reads-to-transcripts mapping result (FPKM values generated by RSEM). For simplification, the transcripts with very similar expression levels among samples from the same population that had null expression in



the other population will be called from here on transcripts “unique” to that region. The “unique” genes were selected by tissue.

The three individuals sampled from each location were considered biological replicates after filtering transcripts with similar expression levels. They were then used in the second step of the analysis between the studied regions. The DE genes were filtered by an FDR of 0.05.

### ***Validating results: quantitative RT-PCR analysis***

To validate the RNA-Seq experiment using qPCR, ten reference genes and 20 DE transcripts were selected. Specific primers were designed using the Primer3 program (Rozen & Skaletsky, 2000) with a target amplicon size of 70-150 bp and an optimal primer length of 20 bp. The chosen primer pairs were first evaluated by PCR using genomic DNA as a template. Those that successfully amplified in three genotypes from each region and presented an amplification efficiency in qPCR of 90-110% were used for expression analysis.

Total RNA (500 ng) from each of the six plants sequenced was used for cDNA synthesis with a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen Inc., USA), which includes a genomic DNA removal step. The cDNAs were diluted (1:20) in nuclease-free water, and 2  $\mu$ L was used for the qPCR reactions.

Quantitative RT-PCR was performed in a CFX384 Real-Time PCR Detection System with iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) following the manufacturer’s instructions with a final primer concentration of 0.3  $\mu$ M. The reactions conditions were as follows: 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 30 sec and 60°C for 1 min. No-template controls for each primer pair were included, and each reaction was performed in triplicate.

The presence of single amplicons in the PCR products was confirmed by melting curve analysis with temperatures ranging from 65°C to 95°C in increments of 0.5°C. The baseline and Cq values were automatically determined, and expression analysis ( $\Delta\Delta$ Ct method) was performed using CFX Manager 2.1 software (Bio-Rad Laboratories Inc., USA).

### ***Gene co-expression network***

The co-regulatory networks were assembled from the reference mapped RNA-Seq data using each biological set for each region. Transcripts showing null values for most of the samples were excluded to diminish noise and to eliminate residuals in the analysis.

A network of correlation was constructed between the contigs of each tissue present in the *R. mangle* transcriptome. The expression values (EM obtained in the RSEM transcript abundance quantification) of the five tissues were used to construct network, calculating Pearson’s Correlation

for each pair of genes. The genes in the network were clustered through the Heuristic Cluster Chiseling Algorithm (HCCA).

The highest reciprocal classification (HRR) method proposed by Mutwill *et al.* was used to select only edges representing the strongest correlations (VALUE  $\leq 30$ ). For this, an HRR less than or equal to 3 was used to empirically filter the edges.

For data analysis and network construction, cytoscape 3.4.0 was used. As the network was formed by many us, for handling and interpreting the same, groups / cluster of interest were selected (mapping). Genes classified as DE genes were selected for visual inspection.

After obtaining the correlation value between all pairs of contigs, five networks were selected based on the DE transcripts of each of the five tissues studied. Each network was then analysed independently based on the annotation and FPKM values of each transcript in each tissue. One layer with the unique transcripts from each population was superimposed on each tissue's network.

### ***Enrichment of gene ontology terms in the network***

To analyse the ontology terms most represented in each network, we subtracted the set of genes present in each network: DE, unique and non-DE, for enrichment analysis in the five most representative clusters of each network.

The treemap of the enriched genes in the network was generated for each tissue with the associated p-values for the GO categories (all greater than 0.05) allowing a similarity of 0.9 through Revigo (Supek *et al.*, 2011). Through the treemap, it is possible to observe the ontology terms that are related to each other based on the distance between the terms and their frequency. The treemap shows the categories through the abs log10 p-value.

## **Results and Discussion**

### ***The development of the reference transcriptome of *R. mangle****

The assembly containing the overlapping contigs between Trinity and Mira *de novo* Assemblers, presented the best metrics when compared to each Software's isolated assembly (Table 1). The mapping of the total set of reads to the selected assembly was very high (96.87%) and similar to the separate mapping of reads obtained from samples belonging to the two populations of interest (SC: 97.03% of reads aligned; PA: 96.68% of reads aligned).

**Table 1. Assembly parameters**

Trinity	Mira	Mira +Trinity
---------	------	---------------

Number of contigs	172,000 no filter (93,762 after filter) size > 200 and 10x coverage	72,059	115,615
Longest contig	22,436	33,550	33,550
Shortest contig	224	149	149
Number of contigs > 1K nt	46,822 (34.0%)	16,300 (22.6%)	47,113 (40.7%)
Mean contig size	1,002	699	1,099
N50	1,680	1,350	1,740

The completeness of the assembly was also inferred by comparing it to BUSCO's Plant dataset (Simão *et al.*, 2015). BUSCO performs a quantitative analysis of how complete an assembly is based on evolutionary expectations of the content of universal single-copy orthologous genes (present in approximately 90% of plants). The assembly recovered almost all orthologous sequences from BUSCO's Plants dataset (97.1%), of which 94% were complete and 2.4% were fragmented.

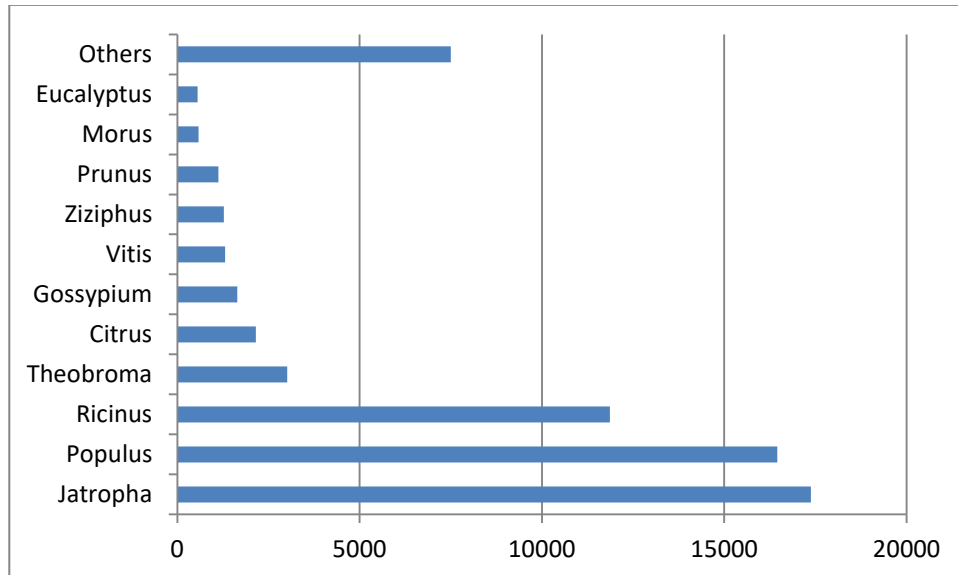
With the merging of the Mira and Trinity assemblies and due to subsequent redundancy filtering, it was possible to generate a transcriptome with a larger number of potential coding sequences (having an initiation codon, a coding region and a termination codon) (Figure 3).



**Figure 3.** A total of 120,399 complete and partial open reading frames (ORFs) and 69,452 complete ORFs were identified in the final assembly of Mira/Trinity; in the Trinity assembly, only 108,485 complete and partial ORFs and 60,523 complete ORFs were identified; and in the Mira assembly, 48,099 complete and partial ORFs and 22,669 complete ORFs were identified.

### Functional annotation

The assembly was blast-aligned against NCBI's Plant RefSeq Database, and 64,867 (56.1%) contigs were annotated. When the annotation redundancies were removed from each contig, 54,058 contigs (46.75%) with unique annotations were obtained. The species that presented the highest number of sequences homologous to our contigs was *Jatropha curcas* with 17,376 contigs, followed by *Ricinus communis* with 11,863 contigs and *Populus trichocarpa* with 8,534 contigs (Figure 4).



**Figure 4.** Distribution species annotation from plant RefSeq

The annotation with the complete database set returned 70,810 transcripts with homology to some protein sequence previously described. Only 44,805 of the transcripts had no similarity to any sequence present in the database. In the gene ontology (GO) analysis, we found 223,743 orthologous genes associated with 44,481 transcripts from the assembly. Of the GO terms found, 53,767 were associated with the hierarchical category of cellular component, 79,746 were associated with molecular function and 90,230 were associated with biological processes.

On the current assembly, We obtained 10,048 new contigs in comparison to the descriptive transcriptome previously developed for *R. mangle* (Dassanayake *et al.*, 2009) using a 454/Roche GSFLX (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) sequencer. Out of the 44,481 annotated contigs from our transcriptome, 34,433 contigs were homologous to the existing transcriptome; the remaining contigs were considered new or undetected to the species.

### ***Detection of SSRs and SNPs***

It was possible to identify 14,283 single nucleotide polymorphisms (SNPs) from transcribed regions. More SNPs were found in Northern samples (14,283) than in Southern samples (8,875) when reads from the Northern and Southern regions were mapped separately. An average of 10,000 SNPs were common between regions (10,416 among Northern samples and the total assembly, 9,690 among Southern samples and the total assembly). Unique SNPs were also identified: 5933 were found in the Northern samples and 2,020 were found in Southern samples.

The greater diversity of SNP markers identified in the transcriptome in the Northern samples agrees with the greater diversity found in previous works using neutral SSRs from *R. mangle* (Francisco *et al.*, unpublished data). This high genomic diversity in the Northern region may be associated with the colonization species' history or with the environment in the North having more relaxed selective pressures than in the South. Mangroves in the Southern region of Brazil may present a homogeneous population in their genomic profile that is also due to historical colonization. Another hypothesis is that the climatic conditions along the Northern Coast, especially temperature, allow some genotypes or genetic profiles to survive the pressures of the environment. In this way, it is important to determine the polymorphic variants of each region.

Based on the detection of SSRs and because the number of reads mapped in the Northern and Southern samples were high, few contigs were analysed that were specific to each region. Thus, the number of SSRs in Santa Catarina (34,289) was similar to that in PA (34,301).

### ***Differential expression***

The expression of 208 genes in the meristem differed significantly: 181 genes were up-regulated in Northern samples, and 27 genes were up-regulated in Southern samples. In the leaves, 192 genes were up-regulated in Northern samples, and 26 genes were up-regulated in Southern samples. In the flowers and stem, more genes were up-regulated in Northern samples than in Southern samples: 202 and 94 (Flowers) and 185 and 75 (Stems) genes, respectively. The root was the only tissue that had more up-regulated genes in Southern samples than in Northern samples (Table 2).

**Table 2. Genes identified with differential expression**

Tissue	Without difference in expression (1st step of DE analysis)	DE between populations (2nd stage of DE) (FDR = 0.5)	Unique
Meristem Pará	13,671	181 up-regulated	2,170
Meristem SC	19,876	27 up-regulated	6,570
Common genes	5,822	208	
Leaf PA	20,350	192 up-regulated	5,971
Leaf SC	14,630	26 up-regulated	2,715
Common genes	6,481	218	
Flower PA	24,164	202 up-regulated	6,908
Flower SC	20,305	94 up-regulated	4,592
Common genes	8,518	296	
Root PA	27,379	83 up-regulated	4,739
Root SC	23,227	123 up-regulated	3,507
Common genes	11,868	206	
Stem PA	16,612	185 up-regulated	1,961
Stem SC	18,865	75 up-regulated	5,501
Common genes	6,557	260	

The state of PA is geographically located at the center of the distribution of red mangroves along the Atlantic Coast of the American continent where conditions are "optimal" for the occurrence of *R. mangle*. During the collection of plant material in the state of PA, forests were observed in advanced stages of development: trees were tall (reaching more than teen meters) and densely distributed. Thus, it would be expected that *R. mangle* individuals at this location would be exposed to a more relaxed environment in comparison to individuals living at the periphery of the species' distribution. Stress should increase polewards because at the poles, one or more factors limit the occurrence of the species. The higher number of down-regulated genes in the Southern samples may indicate negative regulation in response to increased environmental stress. In the leaves from Northern samples, for example, there was a high expression of Heat shock proteins (Hsp90.2), which upon thermal shock are instantly inactivated (Yamada *et al.*, 2007). In addition, the high expression of ethylene-responsive transcription factors may be associated with the down-regulation of genes responding to environmental stressors, stimuli or hormones (Licausi *et al.*, 2013). In stems samples, a high expression of short-chain dehydrogenase and HSF-type DNA-binding proteins, both of which are involved in the negative regulation of genes responding to abiotic stress (Scharf *et al.*, 2012), was observed only for individuals sampled in the Northern population.

### **Gene co-expression network**

A correlation network was constructed between 78,848 genes.

To visualize the relationships among genes in the networks, the nearest neighbour level was chosen. A test was performed on the stem network, and the neighbour level increased by one. The result was that the network of 3,608 genes now had 21,512 genes; this number would be very difficult to work with even though the network would maintain the same pattern between genes from the Northern and Southern populations. In this way, each of the five tissues was analyzed through the nearest neighbor level.

The complete co-expression network of 78,848 transcripts showed a correlation between 78,364 transcripts across 550,916 arcs. A total of 992 clusters were obtained in the network. Each network exhibited two distinct profiles: genes correlated with positive expression in Southern samples and genes correlated with positive expression in Northern samples (Figure 5). Accordingly, the genes with the highest expression level in the Southern samples were closely related to the genes uniquely found in those samples.

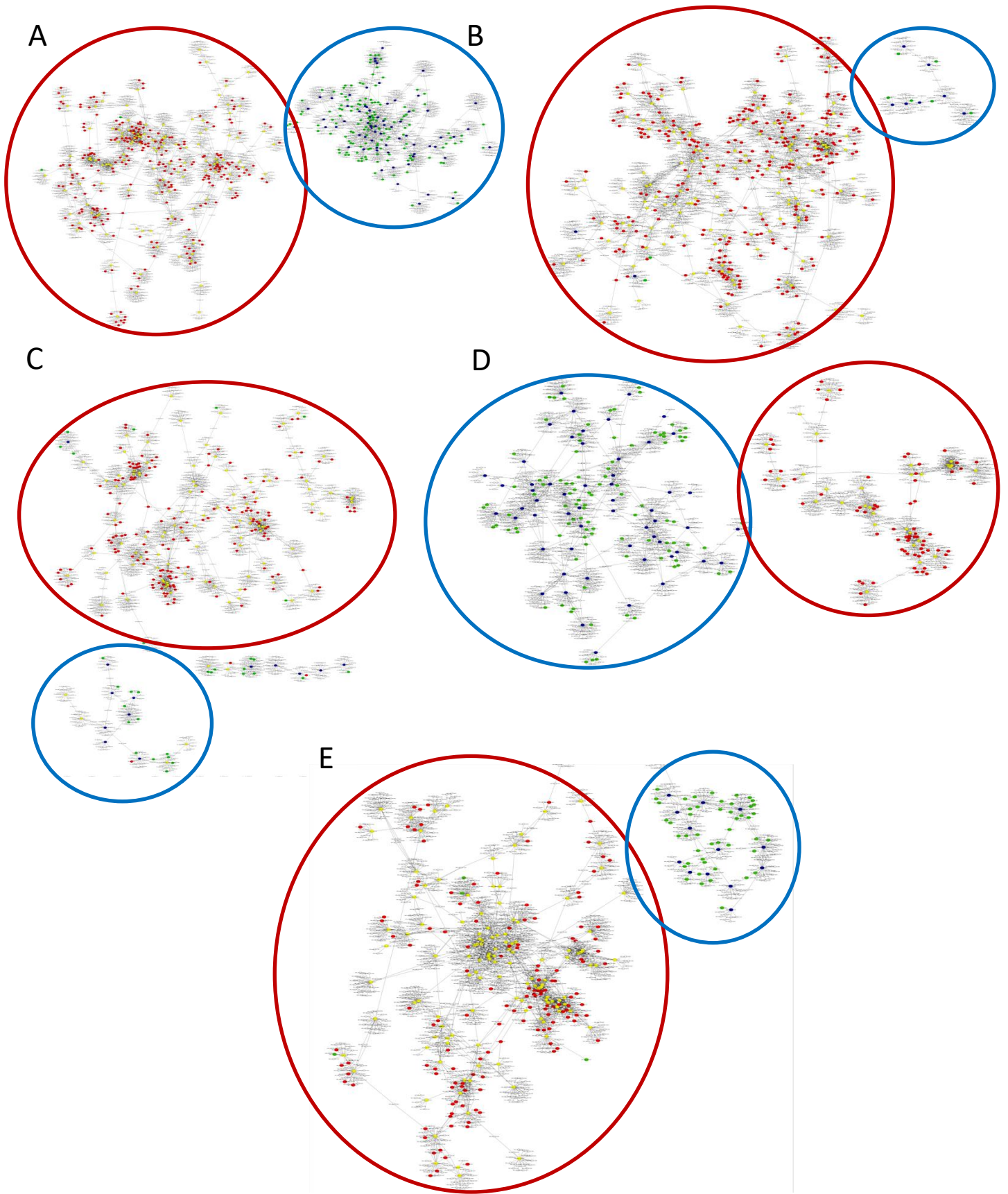
The same structure was observed for highly expressed genes in the Northern samples. The observed profile indicated that differentially expressed (DE) genes and unique genes were co-regulated in samples of each studied region. The distance between the Northern and Southern

clusters could be explained by the distinct abiotic conditions to which the samples were exposed at the moment of sample collection or even historically.

In all networks except the root network, the DE up-regulated genes in PA were in the majority. Thus, the analysis of the five most representative clusters for each network showed more DE genes and unique genes from PA. In general, more unique genes from PA were obtained in the filtering of networks based on differential expression because there were more up-regulated genes in PA.

A large number of the most representative clusters from each tissue-specific network overlapped. These clusters contained genes that were relevant to more than one tissue. However, whenever a cluster repeated itself in more than one network, it was bound to the same population: PA or SC. Among the most representative clusters, we did not find clusters containing DE and unique genes in common for both regions.





**Figure 5.** For all figures showing the networks, the following colour pattern was used to identify gene clusters of *R. mangle* belonging to the Southern and Northern samples: DE genes that were up-regulated in the Northern samples are shown in yellow, and genes that were uniquely expressed in Northern samples are shown in red. The DE genes that were up-regulated in the Southern samples are shown in blue, and the genes unique to these samples are shown in green. A: Flower network; B: Leaf network; C: Meristem network; D: Root network; E: Stem network

**Table 3. The five most representative clusters of each network**

	Number Cluster	ID	Genes on network	All genes on cluster
Stem	17		72	528
	226		69	486
	248		69	93
	11		67	244
	179		58	109
	All genes in the network		3608	
Leaf	98		92	362
	179		68	109
	147		48	97
	392		48	143
	17		45	528
	All genes in the network		2975	
Flower	70		82	63
	292		78	125
	42		70	191
	57		68	288
	248		64	93
	All genes in the network		3859	
Meristem	110		53	144

	392	53	143
	241	49	94
	179	47	109
	248	44	93
	All genes in the network	2648	

Root	302	83	160
	60	69	146
	32	61	321
	91	57	903
	18	55	143
	All genes in the network	2948	

### *Stem network*

The stem network was composed of 635 clusters (table 3). Of the unique stem genes in PA (1961 genes), 174 were present in the stem network and were DE. Of the unique stem genes in SC, 164 were present in the network (Figure 5, e).

### *Root network*

In the root network, we found 184 genes unique to PA and 178 genes unique to SC (Figure 5, d). Overall, the DE and SC network was much larger than the PA network. The root network was the only one with the majority of genes associated with a positive response in SC.

In the DE and PA network, GO terms related to stress response were enriched, such as hyperosmotic salinity, response to biotic stimulus, response to auxin, jasmonic acid mediated, defence response, and intracellular signal. However, many genes were common to both regions but in some way exerted greater influence on the network with DE and only in the population of PA.

### *Meristem network*

In the meristem network, there were 190 unique genes from PA and 52 from SC (Figure 5, c); most genes were DE and unique to PA.

### *Leaf network*

The leaf network followed the same pattern as that of the meristem network (Figure 5, b). There were few up-regulated genes in SC, and only 40 genes were unique to the region. In PA, in contrast, many genes were DE, and 332 were unique.

### *Flower network*

In the flower network, 340 genes were unique to PA, and 196 genes were unique to SC (Figure 5, a).

The grouping of the genes that were unique to SC or PA into ontology terms was very similar. There were many overlapping GO terms representing the same or similar functions. Although trees could respond in similar ways to their environments, we observed through the network that each population had a unique gene interaction complex. These relations among genes unique to the Southern and Northern trees may have originated from the colonization and/or competition of each region. This pattern could be observed in the networks of other tissues as well.

#### ***Validation of the differential expression of transcripts between Southern and Northern samples***

Primer pairs were designed for fifteen DE transcripts: seven uniquely found in leaves and eight uniquely found in roots (Table 4). All primer pairs were tested by PCR using genomic DNA as a template. After qPCR amplification efficiency analysis in cDNA, eleven primer pairs were selected for the DE genes. The selected primers were homologous (>90%) to the following proteins: 2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent), Cellulose synthase A catalytic subunit 6 [UDP-forming], F-box protein (conserved protein), Protein CPR-5, Protein trichome birefringence-like 11, A0A061EHW4\_THECC - Expansin A1, ALPHA, A0A024CBV9\_VITVI - Ovate family protein; Transcription repressor OFP7, Protein indeterminate-domain 5, chloroplastic, PHD finger protein ALFIN-LIKE 7, Gibberellin receptor GID1B, Shikimate kinase 1, chloroplastic, SKP2A\_ARATH - F-box protein SKP2A, Mitogen-activated protein kinase kinase 2, CSC1-like protein ERD4 and Cysteine-rich receptor-like protein kinase (Figure 6 and 7). In general, qPCR results confirmed the differential expression inferred from RNA-sequencing by EDGE-R.

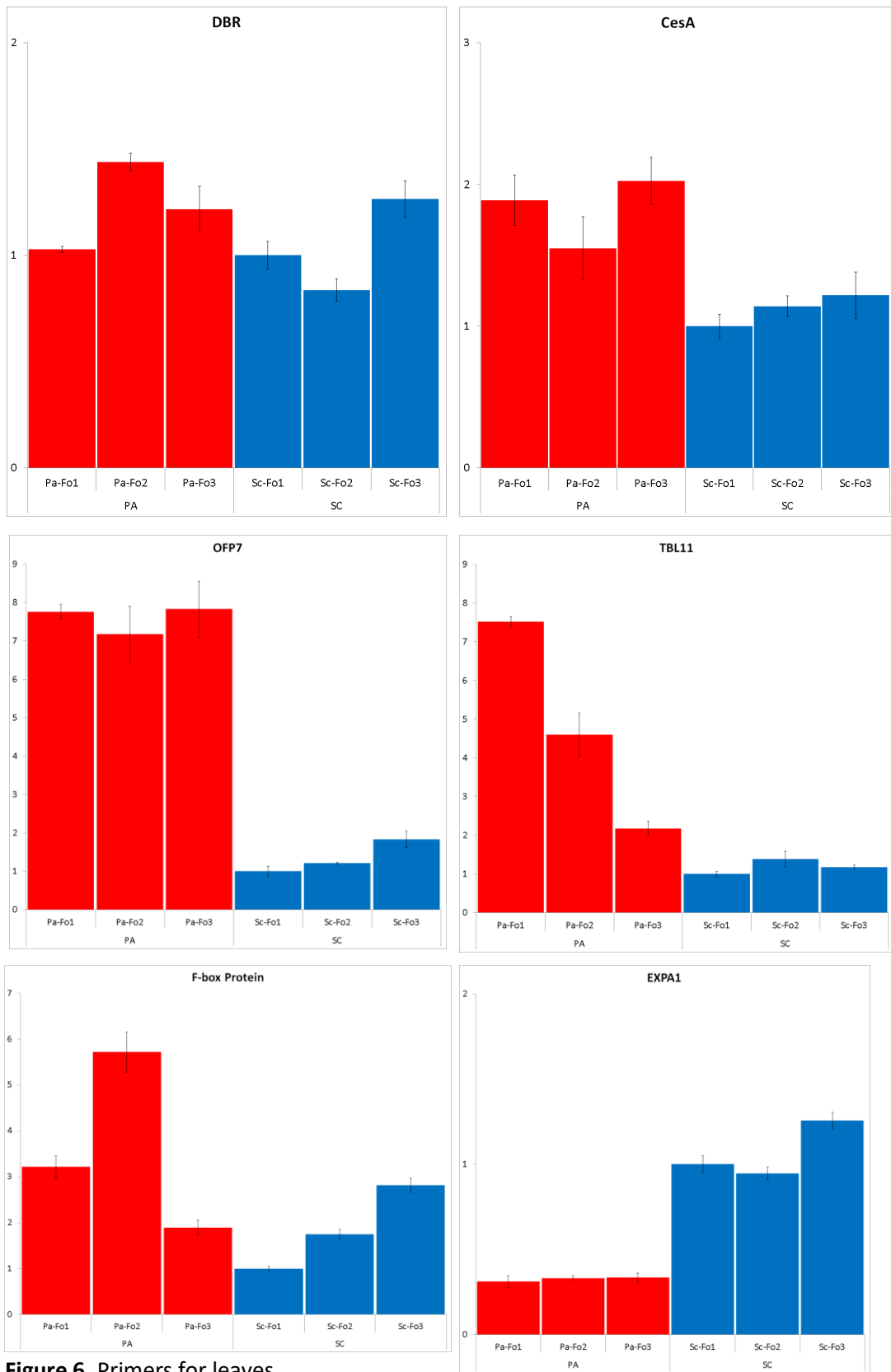
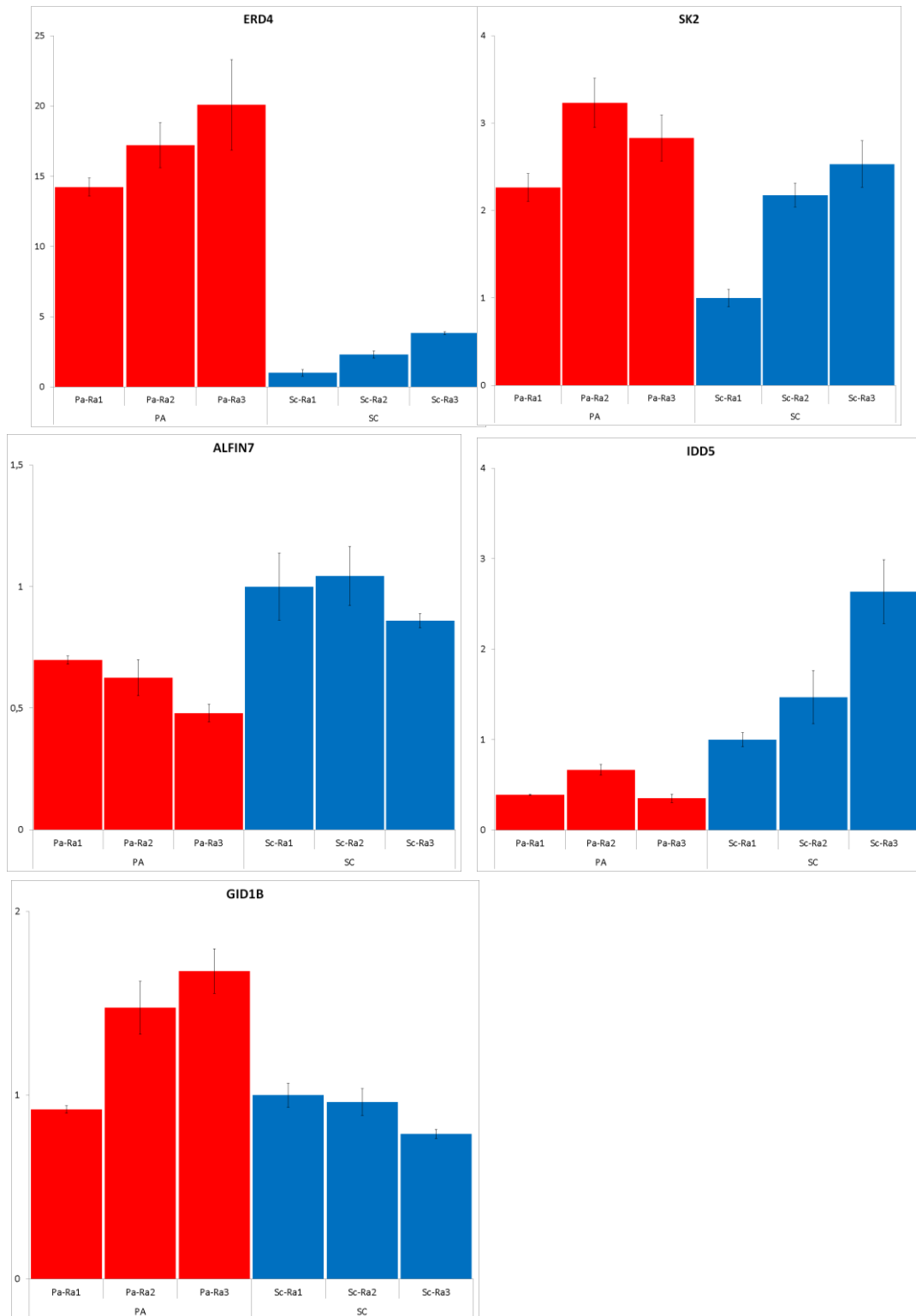


Figure 6. Primers for leaves



**Figure 7.** Primers for root

Exceptionally, primers 01 (leaf), 02 (leaf) and 09 (root) did not present difference of expression between the samples (difference between the groups  $> 0.5$  using students t test). In roots samples, primer 08 presented an opposite result to what was inferred in the computational analysis using sequencing data: Southern samples showed a higher expression than did Northern samples.

### ***Temperature stresses and climate change***

Predicting the effects of climate change on natural populations is a great challenge, especially when considering other global issues, such as increasing sea pollution and increasing human populations (Rockström *et al.*, 2009). To simplify this complex scenario, we considered only a few variables while comparing gene expression data from representative Northern and Southern *R. mangle* samples: temperature stress and climate change, precipitation stress and climate change, development regulation genes, adaptation to low oxygen, flooding, limiting salt intake and water loss, increasing survival of offspring, and mangrove conservation.

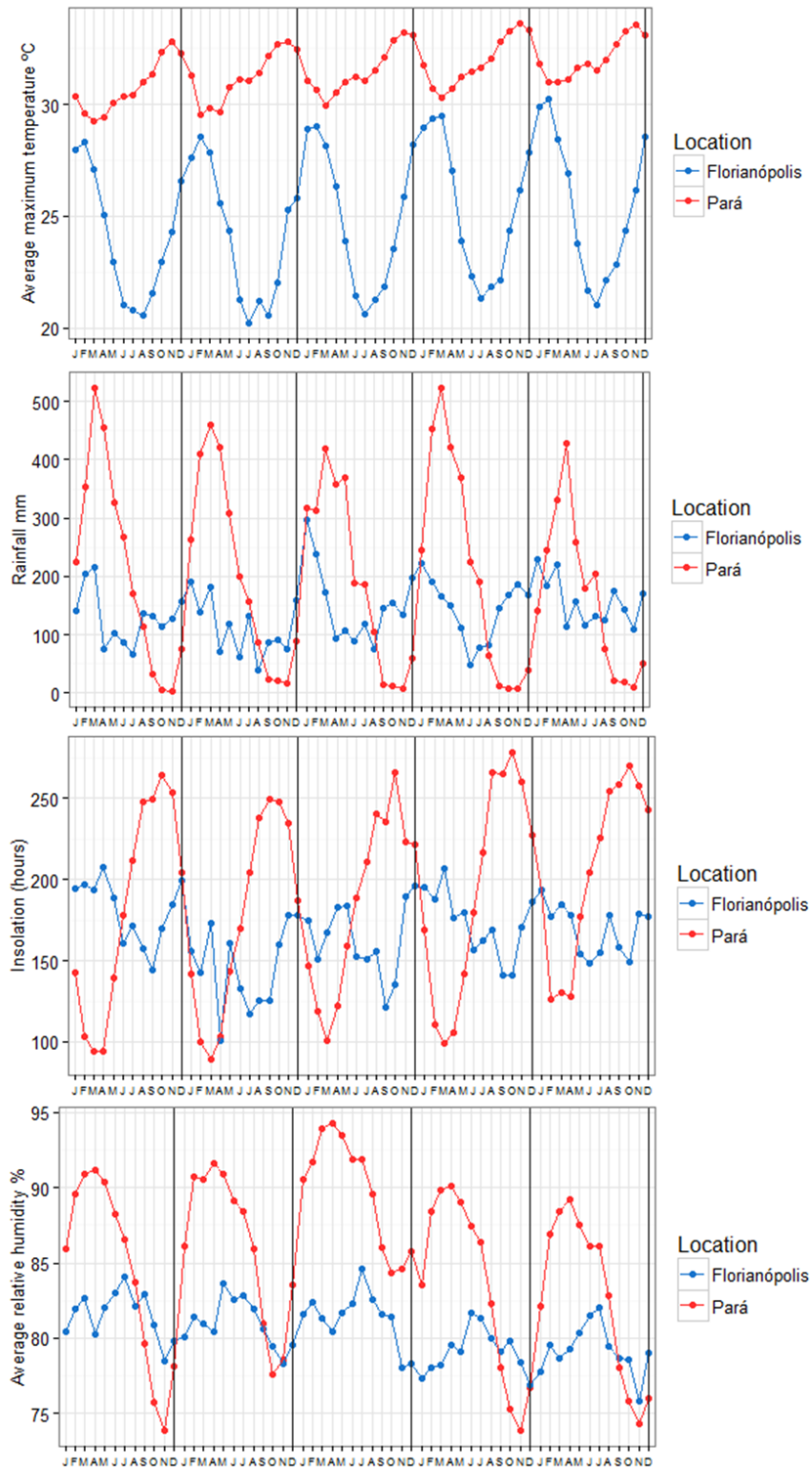
The average global temperature was 0.87 °C above the average of the 20th century according to the National Centers for Environmental Information (NCEI's global terrestrial (GHCN-M version 3.3.0) and oceanic datasets (ERSST version 4.0.0)). By the end of the 21<sup>st</sup> century, an increase in the annual mean air temperature of 3 to 5 °C is expected by the NCEI. There is evidence in the literature of mangroves expanding polewards to their latitudinal limits (Saintilan *et al.*, 2014), such as *Avicennia marina*, which extended its distribution to southern Africa. It is expected that *R. mangle* will advance in SC, coinciding with increasing sea levels, although other specific mechanisms such as dispersion can also have influence.

Increasing atmospheric surface temperatures have increased carbon deposition volume and metabolism in mangrove forests. The production and dispersal of propagules have increased so that the propagules can settle at higher latitudinal limits (Reid & Beaugrand, 2012; Alongi, 2015). In addition, higher temperatures can result in faster growth, reproduction, photosynthesis, respiration, changes in community structure and diversity (Alongi, 2015).

In addition to the abundance of *R. mangle* floating propagules, a stream flowing southward at the mangrove distribution limit at the Atlantic Coast of South America provided a positive mechanism for transporting propagules to colonize sheltered estuarine systems; this mechanism would increase the ability of mangroves to expand their distribution with climate change (Soares *et al.*, 2012). However, Siegle and Asp (2007) described a strong northern current that could hinder dispersion to the southern region (Siegle & Asp, 2007). It is possible that *R. mangle* also encountered problems in its southward expansion in view of characteristics such as smaller roots, trunk size and other peculiarities of southern border representatives within the range of occurrence of the species.

The amplitude of seasonal variation in air temperature in the Brazilian marine ecoregions in PA and SC was very different (Figure 8). The air temperature showed marked seasonal fluctuations in southern South America (SC) and lower ranges (<5 °C) in the Tropical Atlantic (PA) (Bernardino *et al.*, 2015). In this scenario, continuous warming in the tropical ecoregions could negatively impact the species in PA due to thermal stress being greater than its adaptive capacity.





**Figure 8.** Temperature decadal mean (dark line) and rain (grey line) during the 1970-1979, 1980-1989, 1990-1999 and 2000-2010 decades in the tropical marine ecoregions of Brazil, according to the Tracuateua meteorological station (1.06°S/46.90°W). Temperature of Southern America according to the meteorological station of Florianópolis (27.58°S/48.56°W) (Spalding *et al.*, 2007).

According to the gene expression correlation networks obtained for , both SC and PA, many genes linked to heat response allowing plants to occur in an environment ranging from predominantly hot to widely oscillating temperatures was detected on the PA and SC differential expressed genes, respectively.

Cluster 226 (table 3), for example, presented in the stem network linked to differential expression and unique to PA many genes that were annotated with the GO term “response to heat” (GO: 0009408); this demonstrates adaptation to an area of intense heat.

Many genes, such as disease resistance genes, may be affected by temperature. Climate change can alter the distribution, incidence and severity of diseases, as well as host susceptibility. For example, high temperature can increase stem rust epidemics and leaf rust because high temperature is optimal for pathogen growth (Dawson *et al.*, 2015).

Cluster 248, among the most representative in the stem, flower and meristem, was also associated with DE and genes unique to PA, including genes related to "nuclear-transcribed mRNA catabolism" (GO: 0000956), which is related to the response of rice genes to virus infection combined with thermal stress (Xu *et al.*, 2016), and "Lipid metabolism" (GO: 0006629), which is a crucial process throughout the plant's life cycle, especially during response to abiotic or biotic stresses, such as senescence, cold temperatures and phosphate starvation (Li *et al.*, 2016).

Cluster 302 was associated with differential expression and genes in root unique to PA, including genes related to terms that were important for heat response and high light intensity: “protein refolding” (GO: 0042026) and “response to UV” (GO: 0009411).

The GO term “phosphorylation” (GO: 88440) is present in cluster 32 in root and in cluster 60. The term “dephosphorylation” (GO: 0016311) was present in clusters 32 and 179 of leaf, 42 of flower and 226 of stem. The presence of this term in many clusters and in several tissues may be associated with its participation in complex signalling pathways and various regulatory processes in plant cells, including responses to environmental stress, such as temperature (Mishra *et al.*, 2006).

“Proteolysis” (GO: 0006508) is a GO term present in several clusters (clusters 11 and 226 of stem, 110 of meristem, 392 of leaf and 57 of flower) that plays an important role in the traffic of hydrolysed proteins, balancing the recovery of stress and excessive protein degradation resulting in cell death (Diaz-Mendoza *et al.*, 2016). This protein degradation may be caused by excess heat or response to pathogens.

Cluster 98 was present in leaf genes in PA and was associated with the GO terms "macromolecule depalmitoylation", "response to high light intensity", and "shikimate metabolism", which are related to the high-intensity response to UV radiation (Tzin & Galili, 2010). Another GO term that was also present in this cluster, "pectin biosynthesis", is also involved in the response to

different stresses (Houston *et al.*, 2016). The term "response to UV-B" also appeared in leaf PA genes through cluster 329.

Cluster 32 was associated with many genes that were DE and unique to root in SC and with "nonphotochemical quenching", which is linked to the essential regulation of a high light stress photoprotection mechanism. This response in SC roots may be associated with the continuous exposure of the roots to light when the tide does not rise much (Lambrev *et al.*, 2012). There were also genes linked to the GO term "maltose metabolism", which is related to stress response to acute temperatures, such as cold (Kaplan & Guy, 2004). These characteristics are important for the current weather conditions in SC, which experiences cold seasons and is predicted to experience increased temperatures.

### ***Precipitation stress and climate change***

Mangrove forests in the humid tropics have higher biomass and productivity than do those in areas that are more arid or have less rainfall, such as southern Brazil (Alongi, 2015). The rainfall deficit and high salinity predicted for northern Brazil could lead to the loss of mangrove areas due to reduced primary productivity and seedling survival and changes in interspecific competition. These systems are already facing less rainfall and a decreased frequency of extreme precipitation events due to the inter-annual climate variability that is strongly driven by El Niño-Southern Oscillation (Grimm & Tedeschi, 2009). The many metabolic responses in recurrent GO terms in all tissues observed here indicate that the development and growth of *R. mangle* may be limited by the high energy demand in response to abiotic stresses.

In addition, precipitation patterns may also greatly affect the development of pathogenic fungal disease, as an excess or scarcity of relative air humidity is required by most infections (Steffenson, 2003). It is possible to find pathogen response GO terms in genes of the *R. mangle* network, such as "defence response" (GO: 0006952) in cluster 11 of stem and cluster 147 of leaf.

Water deficit and higher salinity can lead to increased evapotranspiration and decreased primary productivity; these effects can limit the tendency of *R. mangle* to experience increased growth in response to both high CO<sub>2</sub> content and low salinity. These metabolic responses can completely alter how *R. mangle* grows as well as its phenology (Alongi, 2015).

In Southern Brazil, where precipitation rates are expected to increase, the radicular system, which is relatively shallow, may be more vulnerable to wave action (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2002).

### ***Developmental control genes***

Stress can also affect growth. Increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentration is expected to promote higher photosynthetic rates and growth in mangrove forests (BALL *et al.*, 1997).

In flower, there were many GO terms related to nutrient metabolism (the clusters described below were all linked to DE genes and unique to flower in PA). Among the five most representative clusters of the network, all were from PA. Cluster 42: "sucrose transport" (GO: 0015770), "negative regulation of catalytic activity" (GO: 0043086), "cell wall modification" (GO: 0042545), "gibberellin biosynthesis" (GO: 0009686), "response to auxin" (GO: 0009733), "pectin catabolism" (GO: 0045490), and "pollen development" (GO: 0009555). Cluster 57: "L-arabinose metabolism" (GO: 0046373), "regulation of cell proliferation" (GO: 0042127), "vesicle docking" (GO: 0048278), "malate metabolism" (GO: 0006108), and "chromatin remodelling" (GO: 0006338). Cluster 292: "hydrogen peroxide catabolism" (GO: 2000295), "N-terminal protein myristoylation" (GO: 0006499), "purine nucleobase transport" (GO: 0006863), and "nitrogen compound metabolism" (GO: 0006499).

"Carbohydrate metabolism" (GO: 0005975) is a GO term that was found in both networks linked to SC and PA, as observed in clusters 32, 302 and 60 in root and cluster 292 in meristem. Cluster 91 was associated with DE and root-unique genes in SC, including genes related to the GO term "sucrase transport" that were linked to reallocation of carbon resources to the roots and biochemical optimization of roots to acquire phosphorus from the soil (Hammond & White, 2008).

In the leaf network, the most enriched GO terms between the unique and DE genes of SC and PA were linked to metabolism and PSII-associated light-harvesting complex II catabolism; the latter is related to chemical reactions and pathways that result in the degradation of one or more components of photosensitive complex II with heat shock annotated genes for example.

### ***Adaptations to low oxygen, flooding, limited salt intake and water loss***

The gene expression of *R. mangle* in each population is adapted to the type of environment in which the plant grows. The perpetually soaked soil of mangroves has little available free oxygen. Anaerobic bacteria release nitrogen gas, soluble iron (iron), inorganic phosphates, sulfides and methane to make the soil much less nutritious. These effects will be less intense in the environments of southern Brazil where flood periods are reduced.

However, on the northern coast of Brazil, where the daily tide level varies dramatically and seasonal episodes of flooding occur, aerial roots play an important role in plant nutrition and respiration by allowing trees to absorb gases directly from the atmosphere and other nutrients, such as iron, from the inhospitable soil. Mangroves store gases directly within the roots, processing them even when the roots are submerged during high tide.

The enrichment of the GO terms "response to oxidative stress" (GO: 0006979), "carbohydrate metabolism" (GO: 0005975) and "N-terminal protein amino acid methylation" (GO: 0006480) in SC roots may indicate that there is an intense effort on the response to this type of stress even if the tide level is low. The response to oxidative stress may be associated with less

availability of oxygen in the soil of southern mangroves. In addition, as predictions of environmental change indicate increased flood frequency in the region, this could represent an adaptive resource for the species in this region.

Cluster 32 was associated with DE genes unique to root in SC and with GO terms related to the response to plant oxidative stress, such as "oxidation-reduction process" (GO: 0055114), "microtubule-based movement" (GO: 0007018), "cell cycle" (GO: 0007049), "methylation" (GO: 0032259), and "cellular amino acid metabolism" (GO: 0006520) (Wang *et al.*, 2011; Pratelli & Pilot, 2014; Kim *et al.*, 2015).

Cluster 91 was associated with genes in the root that were DE and unique to SC and with many GO terms, including "cuticle development" (GO: 0042335); the cuticle provides a physical barrier against water loss and irradiation and is involved with pathogen defence activation (Serrano *et al.*, 2014). There were also the GO terms "light reactions" (GO: 0042548), "photosynthesis" (GO: 0015979), "cellular response to redox state" (GO: 0051775) and "NADH dehydrogenase complex" (GO: 0010258), which are involved in the photosynthetic machinery of oxidative damage and play signalling roles in the regulation of gene expression and protein function in various physiological processes of plants, including acclimatization (Ifuku *et al.*, 2011; Trotta *et al.*, 2014). Identified genes were also related to glycerol ether metabolism, salt tolerance and "osmotic adjustments" through the accumulation of metabolites in plants (Shen *et al.*, 1999). The presence of these molecular mechanisms of regulation in response to oxidative stress is important in the face of future increasing sea levels and flood events in Southern Brazil.

Root was the only tissue in which there were more up-regulated than down-regulated DE genes in SC; these genes can be visualized in the network. Root is the tissue most directly affected by oxidative stress; thus, the positive regulation of genes responding to this type of stress in SC shows that either the local pollution or the salinity of the region demands an energy supply.

In addition, GO terms in cluster 248 associated with flower, meristem and flower genes in PA were related to "brassinosteroid-mediated signalling" (GO: 0009742), in which brassinosteroids control plant stress responses and regulate the expression of stress response genes through cross-talk with other hormones (Divi *et al.*, 2010).

GO terms such as "transport" (GO: 0006810), "phloem or xylem histogenesis" (GO: 0010087), "mitotic cell cycle" (GO: 0000278) and "metabolism" (GO: 0008152) were common and are essential for the survival and development of the plant.

Cluster 179 was also among the five most representative clusters of stem, leaf and meristem, and its nodes were linked to genes that were DE and unique to PA. The most representative GO terms of this cluster included "nuclear-transcribed mRNA catabolism" (GO: 0000956) and "vesicle-mediated transport pathway" (GO: 0016192), which were already described by the constitutive

expression of certain proteins related to increased tolerance to osmotic stress (Mazel *et al.*, 2004). The GO terms "response to auxin" (GO: 0009733) and "potassium ion homeostasis" (GO: 0055075) were related to osmotic adjustments, balancing potassium homeostasis in cell growth, drought stress responses, and high salinity response (Chao *et al.*, 2013; Jung & McCouch, 2013; Osakabe *et al.*, 2013).

Cluster 179 was associated with genes in stem, leaf and meristem that were DE and unique to PA and with GO terms related to "nuclear-transcribed mRNA catabolism", "response to auxin", and "potassium ion homeostasis", which are important for the response to oxidative stress. In PA cluster 226, genes related to "regulation of pH" (GO: 0006885) were also observed; these genes are very important for future predictions of increased salinity in Northern Brazil.

Cluster 17 was associated with the most representative DE genes unique to PA, many of which were associated with the GO term "response to absence of light" (GO: 0009646), which may be related to lack of light during periods of flooding (Van Veen *et al.*, 2016) or may be a reflection of a closed canopy forest. The mechanisms of molecular response to low light intensity and other abiotic stresses of more specific levels (GO: 0009646) reveal that *R. mangle*, even in a tropical region with high levels of solar radiation, has genes aimed at directing its capacity of metabolic readjustments induced by light stress (GO: 0006508); "water transport" (GO: 0006833), "lipid metabolism" (GO: 0006629), and "lignin catabolism" (GO: 0046274), which include functional groups of proteins affected by salt stress (Tran *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2010; Zwack *et al.*, 2016); and "cytokinin metabolism" (GO: 0009690), which increases tolerance to drought, salt and freezing under reduced levels of cytokinin signalling. The genes belonging to GO term "peroxisome fission" (GO: 0016559) were also very prevalent in this cluster. In addition, peroxisomal proliferation is induced in plants by oxidative stress (ROS = reactive oxygen species), UV radiation, saline stress, and even clofibrate (Lopez-Huertas *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2009; Mitsuya *et al.*, 2010; Scharf *et al.*, 2012).

### ***Mangrove conservation***

In approximately 95% of the world's coastal areas, the most recent IPCC forecasts suggest that the sea level will increase by anywhere from 0.26 m (in the most optimistic models) to 0.98 m (in the most pessimistic projections) (IPCC, 2014). The final impact on mangroves varies according to location and results from a complex interaction between increasing sea levels and changes in the basin, including decreased continental flow due to the altered rainfall regime (Dai *et al.*, 2009). Although the increase in sea level is not uniform in all regions, northern populations of red mangroves in Brazil may have an advantage over other mangrove species due to their aerial roots, which are designed to resist greater tidal amplitude; thus, these plants can withstand higher tide levels and have greater chances of colonization of areas of higher altitude.

Change in sea level is the most obvious threat to mangroves (Nicholls & Cazenave, 2010) and is the key variable inducing the specific mangrove response in the northern and southern regions of Brazil. Direct human actions, such as changes in land use, groundwater pumping, dam construction, oil and gas exploration in deltas, and aquaculture, also result in increased salinity of groundwater and surface waters and hydrodynamics of watersheds and changes in the quantity of sediments that reach the coast, as well as alter the erosion-sedimentation balance of the coast and the mobilization of nutrients and pollutants in estuaries (Lacerda *et al.*, 2013; Godoy & Lacerda, 2015). Thus, these actions are threats that will influence mangrove responses to climate change.

In some areas, mangrove restoration programmes already exist where red mangroves are the most common choice for cultivation (Lewis, 2005). Allied to the restoration alternative, it is necessary to raise awareness of the preservation of the gene pool of each mangrove region of Brazil to preserve the ability of *R. mangle* to remain in its areas of occurrence and to colonize new areas.

The combination of advanced adaptive gene studies and a good transcript reference sequence provides a fertile environment for discussing to the challenges of climate change. Knowledge of the genetic and genomic bases of *R. mangle* adaptation to the intertidal environment allows a better understanding of plant resilience under climate change. This study under natural field conditions allowed us to associate specific responses of genes previously described in controlled environments to their responses to the local habitat of the species survival.

The geomorphological, topographical, regional climate and genetic diversity of *R. mangle* produces heterogeneity in the complex network of genes in response to environmental stresses. The broad spectrum of responses that the species presents to the inhospitable environment it inhabits reflects a complex history of continuous disruption and regeneration in each mangrove region. The gene-specific co-expression network for each site indicates that vulnerability to climate change is not a pre-defined condition but is constructed by exposing each population to natural hazards and challenges.

The dynamism inherent to the adaptation strategies of resistance to high-salinity conditions, constant floods, low soil oxygen content and other characteristics of the mangrove forests environment has allowed mangroves to resist and recover from regional natural disturbances.

Exploring these responses as a whole provided insight into the genomic response of *R. mangle* populations to their contrasting environments. In this broad perspective of need to adapt to environmental challenges, it was possible to observe that each region possessed an arsenal of genetic network capable of responding differently to increasing stressors' pressure. The resilience of the species includes a set of regional survival strategies for present and future impacts.

Southern and northern mangroves in Brazil are important sources of alleles; thus, their conservation is necessary to ensure the survival of the species and of the entire ecosystem to which

it belongs, allowing *R. mangle* to retain an arsenal of genes required for different adaptive responses to climate change and its consequences.

Maintaining the local diversity of mangroves is more important than relying on conservation management predictions of a complex and highly unstable adaptive system. That is, actions that preserve the environment and its diversity can maintain the capacity of mangroves to react and maintain their ecosystems even in the face of anticipated climatic changes.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Programa/Edital: Bio Computacional 051/2013; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grants from FAPESP.

### **Author contributions**

APS and MMB designed and coordinated the research. SKB and MVC designed the study, performed the experiments and conducted the fieldwork; CCS performed the experiments; SKB, MVC, NFM and MMB analyzed the data; SKB wrote the manuscript.



## References

- Alongi DM. 2008.** Mangrove forests: resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **76**: 1–13.
- Alongi DM. 2015.** The impact of climate change on mangrove forests. *Current Climate Change Reports* **1**: 30–39.
- Alongi DM, Tirendi F, Clough BF. 2000.** Below-ground decomposition of organic matter in forests of the mangroves *Rhizophora stylosa* and *Avicennia marina* along the arid coast of Western Australia. *Aquatic Botany* **68**: 97–122.
- Anders S, Huber W. 2010.** Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**: R106.
- Ball, B.C., Smith, K.A., Klemetsson, L., Brumme, R., Sitaula, B.K., Hansen, S. et al. 1997.** The influence of soil gas transport properties on methane oxidation in a selection of northern European soils. *Journal of Geophysical Research*, **102**: 23309–23317.
- Beaumont LJ, Pitman A, Perkins S, Zimmermann NE, Yoccoz NG, Thuiller W. 2011.** Impacts of climate change on the world's most exceptional ecoregions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 2306–2311.
- Bernardino AF, Netto SA, Pagliosa PR, Barros F, Christofoletti RA, Filho JS, Colling A, Lana PC. 2015.** Predicting ecological changes on benthic estuarine assemblages through decadal climate trends along Brazilian marine ecoregions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **166**: 74–82.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009.** BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 421.
- Ceron-Souza I, Rivera-Ocasio E, Medina E, Jimenez JA, McMillan WO, Bermingham E. 2010.** Hybridization and introgression in new world red mangroves, *Rhizophora* (Rhizophoraceae). *American Journal of Botany* **97**: 945–957.
- Chao DY, Dilkes B, Luo H, Douglas A, Yakubova E, Lahner B, Salt DE. 2013.** Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science* **341**: 658–659.
- Cheong S-M, Silliman B, Wong PP, van Wesenbeeck B, Kim C-K, Guannel G. 2013.** Coastal adaptation with ecological engineering. *Nature Climate Change* **3**: 787–791.
- Chevreur B, Wetter T, Suhai S. 1999.** Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB) **99**: 45–56
- Cohen MCL, Behling H, Lara RJ, Smith CB, Matos HRS, Vedel V. 2009.** Impact of sea-level and climatic changes on the Amazon coastal wetlands during the late Holocene. *Vegetation History and Archaeobotany* **18**: 425–439.

- Cohen MCL, Lara RJ. 2003.** Temporal changes of mangrove vegetation boundaries in Amazônia: application of GIS and remote sensing techniques. *Wetlands Ecology and Management* **11**: 223–231.
- Cohen MCL, Lara RJ, Smith CB, Angélica RS, Dias BS, Pequeno T. 2008.** Wetland dynamics of Marajó Island, northern Brazil, during the last 1000 years. *CATENA* **76**: 70–77.
- Collins M, Knutti R, Arblaster J, Dufresne J-L, Fichet T, Friedlingstein P, Gao X, Gutowski W, Johns T, Krinner G, et al. 2013.** Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University. Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Cunha-Lignon M, Kampel M, Menghini R, Schaeffer-Novelli Y, Cintrón G, Dahdouh-Guebas F. 2011.** Mangrove forests submitted to depositional processes and salinity variation investigated using satellite images and vegetation structure surveys. *Journal of Coastal Research* **SI**: 344–348.
- Dai, A., T. Qian, K.E. Trenberth and J.D. Millman. 2009.** Changes in continental freshwater discharge from 1948 to 2004. *J. Climate*, **22**: 2773-2779.
- Dassanayake M, Haas JS, Bohnert HJ, Cheeseman JM. 2009.** Shedding light on an extremophile lifestyle through transcriptomics. *New Phytologist* **183**: 764–775.
- Dawson IK, Russell J, Powell W, Steffenson B, Thomas WTB, Waugh R. 2015.** Barley: a translational model for adaptation to climate change. *New Phytologist* **206**: 913–931.
- Day JW, Christian RR, Boesch DM, Yáñez-Arancibia A, Morris J, Twilley RR, Naylor L, Schaffner L, Stevenson C. 2008.** Consequences of climate change on the ecogeomorphology of coastal wetlands. *Estuaries and Coasts* **31**: 477–491.
- de Almeida LQ, Welle T, Birkmann J. 2016.** Disaster risk indicators in Brazil: a proposal based on the world risk index. *International Journal of Disaster Risk Reduction* **17**: 251–272.
- Debortoli NS, Camarinha PIM, Marengo JA, Rodrigues RR. 2017.** An index of Brazil's vulnerability to expected increases in natural flash flooding and landslide disasters in the context of climate change. *Natural Hazards* **86**: 557–582.
- Diaz-Mendoza M, Velasco-Arroyo B, Santamaria ME, González-Melendi P, Martinez M, Diaz I. 2016.** Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology* **39**: 329–338.

- Dinerstein, E, Olson DM.; Graham DJ, Webster AL, Primm SA, Bookbinder MP, Ledec G. 1995.** A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean. Washington DC. World Wildlife Fund.
- Divi UK, Rahman T, Krishna P. 2010.** Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology* **10**: 151.
- Dolbeth M, Cardoso PG, Grilo TF, Bordalo MD, Raffaelli D, Pardal MA. 2011.** Long-term changes in the production by estuarine macrobenthos affected by multiple stressors. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **92**: 10–18.
- Donato DC, Kauffman JB, Murdiyarso D, Kurnianto S, Stidham M, Kanninen M. 2011.** Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. *Nature Geoscience* **4**: 293–297.
- Duke NC, Meynecke JO, Dittmann S, Ellison AM, Anger K, Berger U, Cannicci S, Diele K, Ewel KC, Field CD *et al.* 2007.** A world without mangroves? *Science* **317**: 41b–42b.
- Eizaguirre C, Baltazar-Soares M. 2014.** Evolutionary conservation-evaluating the adaptive potential of species. *Evolutionary Applications* **7**: 963–967.
- Ellison AM, Farnsworth EJ, Merkt RE. 1999.** Origins of mangrove ecosystems and the mangrove biodiversity anomaly. *Global Ecology and Biogeography* **8**: 95–115.
- Ellison JC. 2015.** Vulnerability assessment of mangroves to climate change and sea-level rise impacts. *Wetlands Ecology and Management* **23**: 115–137.
- FAO. 2010.** Managing forests for climate change.
- Ferreira TO, Vidal-Torrado P, Otero XL, Macías F. 2007.** Are mangrove forest substrates sediments or soils? A case study in southeastern Brazil. *CATENA* **70**: 79–91.
- Gillanders B, Kingsford M. 2003.** Impact of changes in flow of freshwater on estuarine and open coastal habitats and the associated organisms. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review* **40**: 233–309.
- Gilman EL, Ellison J, Duke NC, Field C. 2008.** Threats to mangroves from climate change and adaptation options: a review. *Aquatic Botany* **89**: 237–250.
- Giri C, Ochieng E, Tieszen LL, Zhu Z, Singh A, Loveland T, Masek J, Duke N. 2011.** Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography* **20**: 154–159.
- Godoy MDP, Lacerda LDD. 2015.** Mangroves response to climate change: a review of recent findings on mangrove extension and distribution. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **87**: 651–667.

- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q *et al.* 2011.** Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* **29**: 644–652.
- Grimm AM, Tedeschi RG. 2009.** ENSO and extreme rainfall events in South America. *Journal of Climate* **22**: 1589–1609.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M *et al.* 2013.** *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* **8**: 1494–1512.
- Hammond JP, White PJ. 2008.** Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation, *Journal of Experimental Botany* **59**: 93–109.
- Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N, Little A. 2016.** The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **7**: 984.
- Ifuku K, Endo T, Shikanai T, Aro EM. 2011.** Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant and Cell Physiology* **52**: 1560–1568.
- IPCC. 2014.** Climate Change 2014. 2014. Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Switzerland.
- Jeon J, Kim NY, Kim S, Kang NY, Novak O, Ku SJ, Cho C, Lee DJ, Lee EJ, Strnad M *et al.* 2010.** A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 23371–23386.
- Jung JKH, McCouch S. 2013.** Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science* **4**: 186.
- Kaplan F, Guy CL. 2004.**  $\beta$ -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* **135**: 1674–1684.
- Kim J-M, Sasaki T, Ueda M, Sako K, Seki M. 2015.** Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**: 114.
- Krauss KW, Lovelock CE, McKee KL, López-Hoffman L, Ewe SML, Sousa WP. 2008.** Environmental drivers in mangrove establishment and early development: a review. *Aquatic Botany* **89**: 105–127.
- Lacerda LD, Dias FJS, Marins RV, Soares TM, Godoy JMO, Godoy MLDP. 2013.** Pluriannual watershed discharges of Hg into a tropical semi-arid estuary of the Jaguaribe river, NE Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **24**: 1719–1731.

- Lambrev PH, Miloslavina Y, Jahns P, Holzwarth AR. 2012.** On the relationship between non-photochemical quenching and photoprotection of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**: 760–769.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009.** Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* **10**: R25.
- Lara RJ, Cohen MCL. 2009.** Palaeolimnological studies and ancient maps confirm secular climate fluctuations in Amazonia. *Climatic Change* **94**: 399–408.
- Lewis RR. 2005.** Ecological engineering for successful management and restoration of mangrove forests. *Ecological Engineering* **24**: 403–418.
- Li B, Dewey CN. 2011.** RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**: 323.
- Li N, Xu C, Li-Beisson Y, Philippar K. 2016.** Fatty acid and lipid transport in plant cells. *Trends in Plant Science* **21**: 145–158.
- Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P. 2013.** APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist* **199**: 639–649.
- Loarie SR, Duffy PB, Hamilton H, Asner GP, Field CB, Ackerly DD. 2009.** The velocity of climate change. *Nature* **462**: 1052–1055.
- Lopez-Huertas E, Charlton W, Johnson B, Graham I, Baker A. 2000.** Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal* **19**: 6770–6777.
- Mazel A, Leshem Y, Tiwari B, Levine A. 2004.** Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiology* **134**: 118–128.
- McKee K, Rogers K, Saintilan N. 2012.** Response of salt marsh and mangrove wetlands to changes in atmospheric CO<sub>2</sub>, climate, and sea level. In: Middleton BA, ed. *Global change and the function and distribution of wetlands*. Dordrecht: Springer Nature, 63–96.
- McKee KL, Cahoon DR, Feller IC. 2007.** Caribbean mangroves adjust to rising sea level through biotic controls on change in soil elevation. *Global Ecology and Biogeography* **16**: 545–556.
- McKee KL, Rooth JE. 2008.** Where temperate meets tropical: multi-factorial effects of elevated CO<sub>2</sub>, nitrogen enrichment, and competition on a mangrove-salt marsh community. *Global Change Biology* **14**: 971–984.
- Milliman JD, Farnsworth KL, Jones PD, Xu KH, Smith LC. 2008.** Climatic and anthropogenic factors affecting river discharge to the global ocean, 1951–2000. *Global and Planetary Change* **62**: 187–194.

- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N. 2006.** Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **452**: 55–68.
- Mitsch WJ, Bernal B, Nahlik AM, Mander Ü, Zhang L, Anderson CJ, Jørgensen SE, Brix H. 2013.** Wetlands, carbon, and climate change. *Landscape Ecology* **28**: 583–597.
- Mitsuya S, El-Shami M, Sparkes IA, Charlton WL, Lousa CDM, Johnson B, Baker A. 2010.** Salt stress causes peroxisome proliferation, but inducing peroxisome proliferation does not improve NaCl tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **5**: e9408.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008.** Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. **5(7)**:621-8.
- Nettel A, Dodd RS. 2007.** Drifting propagules and receding swamps: genetic footprints of mangrove recolonization and dispersal along tropical coasts. *Evolution* **61**: 958–971.
- Nicholls RJ, Cazenave A. 2010.** Sea-level rise and its impact on coastal zones. *Science* **328**: 1517–1520.
- Osakabe Y, Arinaga N, Umezawa T, Katsura S, Nagamachi K, Tanaka H, Ohiraki H, Yamada K, Seo SU, Abo M et al. 2013.** Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 609–624.
- Patel RK, Jain M. 2012.** NGS QC toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One* **7**: e30619.
- Pessenda LCR, Vidotto E, De Oliveira PE, Buso AA, Cohen MCL, Rossetti DDF, Ricardi-Branco F, Bendassolli JA. 2012.** Late quaternary vegetation and coastal environmental changes at Ilha do Cardoso mangrove, southeastern Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **363–364**: 57–68.
- Pil MW, Boeger MRT, Muschner VC, Pie MR, Ostrensky A, Boeger WA. 2011.** Postglacial north-south expansion of populations of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the Brazilian coast revealed by microsatellite analysis. *American Journal of Botany* **98**: 1031–1039.
- Polidoro BA, Carpenter KE, Collins L, Duke NC, Ellison AM, Ellison JC, Farnsworth EJ, Fernando ES, Kathiresan K, Koedam NE et al. 2010.** The loss of species: mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. *PLoS One* **5**: e10095.
- Pratelli R, Pilot G. 2014.** Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 5535–5556.
- Reid PC, Beaugrand G. 2012.** Global synchrony of an accelerating rise in sea surface temperature. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **92**: 1435–1450.
- Rockström J, Steffen W, Noone K, Persson Å, Chapin FS, Lambin EF, Lenton TM, Scheffer M, Folke C, Schellnhuber HJ et al. 2009.** A safe operating space for humanity. *Nature* **461**: 472–475.

- Rozen S, Skaletsky H. 2000.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**: 365–386.
- Saintilan N, Wilson NC, Rogers K, Rajkaran A, Krauss KW. 2014.** Mangrove expansion and salt marsh decline at mangrove poleward limits. *Global Change Biology* **20**: 147–157.
- Sandoval-Castro E, Muñiz-Salazar R, Enríquez-Paredes LM, Riosmena-Rodríguez R, Dodd RS, Tovilla-Hernández C, Arredondo-García MC. 2012.** Genetic population structure of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) along the northwestern coast of Mexico. *Aquatic Botany* **99**: 20–26.
- Schaeffer-Novelli Y, Cintron-Molero G, Soares MLG. 2002.** Chapter nine mangroves as indicators of sea level change in the muddy coasts of the world. *Proceedings in Marine Science* **4**: 245–262.
- Schaeffer-Novelli Y, Soriano-Sierra EJ, Vale CCD, Bernini E, Rovai AS, Pinheiro MAA, Schmidt AJ, Almeida RD, Júnior CC, Menghini RP et al. 2016.** Climate changes in mangrove forests and salt marshes. *Brazilian Journal of Oceanography* **64**: 37–52.
- Scharf K-D, Berberich T, Ebersberger I, Nover L. 2012.** The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**: 104–119.
- Semeniuk V. 2013.** Predicted response of coastal wetlands to climate changes: a Western Australian model. *Hydrobiologia* **708**: 23–43.
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux J-P. 2014.** The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* **5**: 274.
- Shen B, Hohmann S, Jensen RG, Bohnert, HJ. 1999.** Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in Yeast. *Plant Physiology* **121**: 45–52.
- Sherrod C, McMillan C. 1985.** The distributional history and ecology of mangrove vegetation along the northern Gulf of Mexico coastal region. *Contributions in Marine Science* **28**: 129–140.
- Short FT, Neckles HA. 1999.** The effects of global climate change on seagrasses. *Aquatic Botany* **63**: 169–196.
- Siegle E, Asp NE. 2007.** Wave refraction and longshore transport patterns along the southern Santa Catarina coast. *Brazilian Journal of Oceanography* **55**: 109–120.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM. 2015.** BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* **31**: 3210–3212.
- Sinclair AM, Trobacher CP, Mathur N, Greenwood JS, Mathur J. 2009.** Peroxule extension over ER-defined paths constitutes a rapid subcellular response to hydroxyl stress. *The Plant Journal* **59**: 231–242.

- Soares MLG, Estrada GCD, Fernandez V, Tognella MMP. 2012.** Southern limit of the Western South Atlantic mangroves: assessment of the potential effects of global warming from a biogeographical perspective. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **101**: 44–53.
- Steffenson B. 2003.** Fusarium head blight of barley: impact, epidemics, management, and strategies for identifying and utilizing genetic resistance. In: Leonard K, Bushnell W, eds. *Fusarium head blight of wheat and barley*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 241–295.
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. 2011.** REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**: e21800.
- Tomlinson P. 1986.** *The botany of mangroves*. New York: Cambridge University Press.
- Tran LSP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007.** Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20623–20628.
- Trotta A, Rahikainen M, Konert G, Finazzi G, Kangasjarvi S. 2014.** Signalling crosstalk in light stress and immune reactions in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**: 20130235.
- Tzin V, Galili G. 2010.** New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant* **3**: 956–972.
- Van Veen H, Vashisht D, Akman M, Girke T, Mustroph A, Reinen E, Hartman S, Kooiker M, van Tienderen P, Schranz ME et al. 2016.** Transcriptomes of eight *Arabidopsis thaliana* accessions reveal core conserved, genotype- and organ-specific responses to flooding stress. *Plant Physiology* **172**: 668–689.
- Wang C, Zhang L-J, Huang R-D. 2011.** Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 29–31.
- Ward RD, Friess DA, Day RH, MacKenzie RA. 2016.** Impacts of climate change on mangrove ecosystems: a region by region overview. *Ecosystem Health and Sustainability* **2**: e01211.
- Woodroffe CD. 1990.** The impact of sea-level rise on mangrove shorelines. *Progress in Physical Geography* **14**: 483–520.
- Xu D, Zhong T, Feng W, Zhou G. 2016.** Tolerance and responsive gene expression of *Sogatella furcifera* under extreme temperature stresses are altered by its vectored plant virus. *Scientific Reports* **6**: 31521.
- Yamada K, Fukao Y, Hayashi M, Fukazawa M, Suzuki I, Nishimura M. 2007.** Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 37794–37804.



Zwack PJ, De Clercq I, Howton TC, Hallmark HT, Hurny A, Keshishian EA, Parish AM, Benkova E, Mukhtar MS, Van Breusegem F *et al.* 2016. Cytokinin response factor 6 represses cytokinin-associated genes during oxidative stress. *Plant Physiology* **172**: 1249–1258.

## Supporting Information

#### Table 4. Primers for rt-PCR

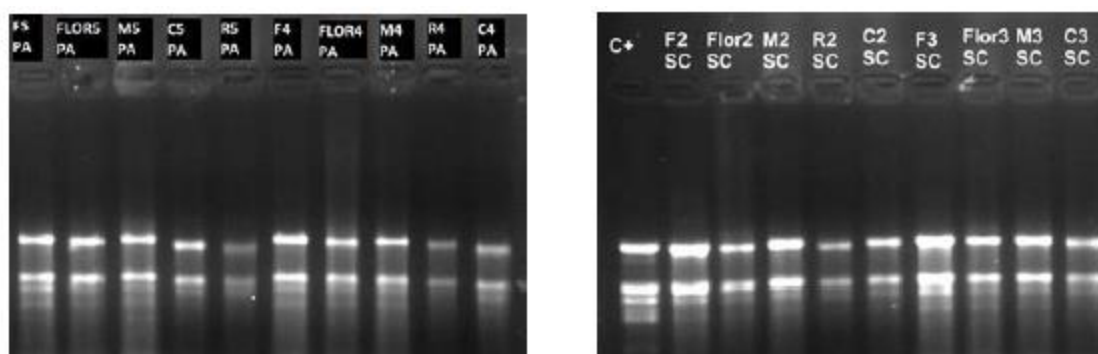
									Annealing Temperature	Annealing Temperatures	Expected product size
Primer	Homologous gene name	Species	Fold-change	SC	PA	Primer left	Primer Right				
108	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)	(Nicotiana glauca)	0.000137937		72.4	AAACA	ACAGG				
(Primer 1)					8647	GATCCA	GACAA				
731					5765	CGGTC	CTTCTG				133 bp
32		(Arabidopsis thaliana)	0.00013875	0	754	CTGATC	ACCAC	60.1 C	59.9 C		
(Primer 2)	Cellulose synthase A catalytic subunit 6 [UDP-forming]				87.7	TGCCCCA	ATAGC				
892					1269	CAGTG	CTCCG				
92	F-box protein At1g78100 (conserved protein)	(Arabidopsis thaliana)	0.000137948		9782	CAAAA	CAATTT				149 bp
(Primer 3)					9039	CAAG	GCTC	59.8 C	58.7 C		
757											
1						AGATA	TTGCG				
(Primer 4)					7,24	ATGCCT	TGATT				
134					808E	CGCTG	CTCGG				135 bp
37					+13	ATGC	GTTTG	58.2 C	59.1 C		
(Primer 5)	Protein CPR-5	Arabidopsis thaliana			13.1	TGCGG	TTTTGC				
134					7637	6657	ATGTCC	GTGGA			
37					5532	0536	AAGCA	TGCAT			
(Primer 5)					1332	4268	ATTG	TGGG	59.5 C	60.0 C	99 bp
134											
37					14.7	65.3	GCCTC	GCAGT			
(Primer 5)	Protein trichome birefringence-like 11	Arabidopsis thaliana			7584	9865	GCTAAC	CAGAC			
358					0057	3569	CTTTTC	ATTCTC			
					3816	6591	CAATC	GCAAC	59.9 C	59.9 C	90 bp
	A0A061EHW4 TH	Theobroma			62.6	6.69	TCGCTG	TTCCAT	59.4 C	60.0 C	147



Foram testados cinco protocolos não comerciais de extração de RNA: (Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, 2008; Gesteira et al., 2003; Rezaian & Krake, 1987; Rio et al., 2014 e Concert Invitrogen) para averiguação do mais eficiente. Os protocolos de extração avaliados apresentaram diversos problemas com relação a qualidade do RNA extraído como, por exemplo, degradação, contaminação por DNA genômico e de outros compostos da planta e de compostos químicos utilizados na extração, que nos impediam de utilizar o material obtido para a construção das bibliotecas de cDNA. Alguns métodos de purificação (NORGEN – RNA Clean-Up Concentration Kit e Zymo Research – RNA Clean & Concentrator) foram utilizados nas amostras de RNA extraídos com os protocolos citados acima, como uma

tentativa de melhorar a qualidade do RNA. Entretanto, a purificação prometida pelos métodos não foi bem sucedida.

Além dos protocolos caseiros foram avaliados outros cinco kits de extração de RNA comerciais, dos seguintes fabricantes: Norgen Biotek (Total RNA Purification Kit), Zymo Research (Quick – RNA Miniprep), Thermo Scientific (GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit), Sigma (Spectrum Plant Total RNA Kit), Qiagen (RNeasy Plant Mini Kit) e Agilent (Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit). Apenas o kit da Agilent permitiu isolar RNA íntegro e de qualidade para todos os tecidos como mostra a Figura 3.



**Figura 3:** Gel de agarose 1% com as amostras de RNA utilizadas para a construção de bibliotecas de cDNA. Como se pode observar, as amostras de raiz (nomeadas com R) apresentam uma banda de rRNA com menor intensidade, devido à dificuldade de isolar o RNA deste tipo de tecido.

A grande dificuldade enfrentada quanto à extração de RNA de boa qualidade ocorreu pelo fato da espécie estudada acumular, em seus tecidos, grande quantidade de metabólitos secundários, tais como tanino (Godoy et al., 1997). Tal acúmulo é considerado uma adaptação da planta ao elevado teor salino da água e dos sedimentos nos quais ela vive (Coley et al., 1985). Há também uma tendência ao acúmulo de substâncias fenólicas em plantas submetidas a condições de estresse fisiológico (Gershenzon et al., 1984) podendo portanto, haver esses compostos também em quantidades elevadas em folhas de espécies de plantas do manguezal. O elevado teor de tanino foliar e de compostos fenólicos em árvores de mangue pode contribuir para um fornecimento regular de nutrientes para as plantas dos manguezais, na medida em que essas substâncias retardam a decomposição da serapilheira (Zucker, W.Z., 1983 & Adaime, R.R., 1985).

Estes compostos secundários, de grande importância em manguezais, são muito difíceis de serem retirados durante o processo de extração de RNA, formando um líquido viscoso que persiste até os últimos passos da extração, com a formação de um pellet muito maior que o esperado por conter substâncias não desejadas junto ao RNA.

## 5.2. Construção das Bibliotecas de cDNA

Para a construção das bibliotecas de cDNA foram selecionados três indivíduos de uma população natural localizada no município de Bragança, no Pará (00.64616 47.26404; 00.65697 47.26457; 00.64804 47.26389 ) e três indivíduos de uma população natural localizada no município de Florianópolis, em Santa Catarina (27.27806 48.51941; 27.65799 48.52684 ; 27.65878 48.52747 ). As amostras selecionadas para o sequenciamento apresentavam RNA de melhor qualidade de um total de 12 indivíduos amostrados nas duas localidades. Cinco diferentes tecidos foram amostrados para cada um dos três indivíduos de cada região, totalizando 30 bibliotecas de cDNA. Os tecidos utilizados foram: Folhas, Caules, Raízes, Flores e Meristemas. Foi utilizada uma quantidade de 1 µg de RNA para a construção das bibliotecas.

**Tabela 1: Identificação das amostras de RNA utilizadas em cada Biblioteca de cDNA, nomeadas pelo número do indivíduo coletado e o tipo de material vegetal (F –folha; FR –flor; M- Meristema; R –raiz; C –caule); concentração de RNA obtido na extração e seus respectivos valores da razão 260/280 e 260/230.**

AMOSTRAS DE	Amostra	conc. (ng/µl)	260/280	260/230
SC				
1	Rmangle F2 SC	508.0	2.0	1.8
2	Rmangle FR2 SC	214.0	1.9	1.1
3	Rmangle M2 SC	145.0	2.0	1.9
4	Rmangle R2* SC	41.2	2.0	1.4
5	Rmangle C2 SC	147.0	1.9	1.2
6	Rmangle F3 SC	336.0	2.0	2.1
7	Rmangle FR3 SC	187.0	1.9	1.9
8	Rmangle M3 SC	258.0	2.0	1.7
9	Rmangle R3 SC	39.6	2.0	1.0
10	Rmangle C3 SC	230.0	1.9	1.0
11	Rmangle F4 SC	189.2	1.9	1.9
12	Rmangle FR4 SC	100.0	1.9	1.5
13	Rmangle M4 SC	87.6	1.9	1.5
14	Rmangle R4 SC	48.8	1.6	0.9
15	Rmangle C4 SC	173.6	1.9	1.3
AMOSTRAS DO PARÁ	Amostra	conc. (ng/µl)	260/280	260/230
1	Rmangle F1 PA	237.6	2.0	1.9
2	Rmangle FR1 PA	165.2	2.0	1.6
3	Rmangle M1 PA	126.4	2.1	1.8
4	Rmangle R1 PA	152.4	1.9	1.1
5	Rmangle C1 PA	134.8	1.9	1.0
6	Rmangle F4 PA	231.0	2.0	1.6
7	Rmangle FR4 PA	98.8	1.9	1.0
8	Rmangle M4 PA	149.0	1.9	1.5
9	Rmangle R4 PA	50.0	1.8	1.7
10	Rmangle C4 PA	80.0	1.9	1.1
11	Rmangle F5 PA	177.2	2.0	1.9
12	Rmangle FR5 PA	110.4	2.1	1.8
13	Rmangle M5 PA	109.2	2.1	1.9
14	Rmangle R5 PA	33.2	2.0	0.6
15	Rmangle C5 PA	150.8	1.9	0.9

Após a construção das bibliotecas, as mesmas foram validadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif.). Como esperado, os resultados demonstraram maior concentração dos fragmentos no tamanho de 260 pb (Figura 4), sendo aproximadamente 150 pb o tamanho do fragmento de cDNA acrescido à 110 pb dos adaptadores.

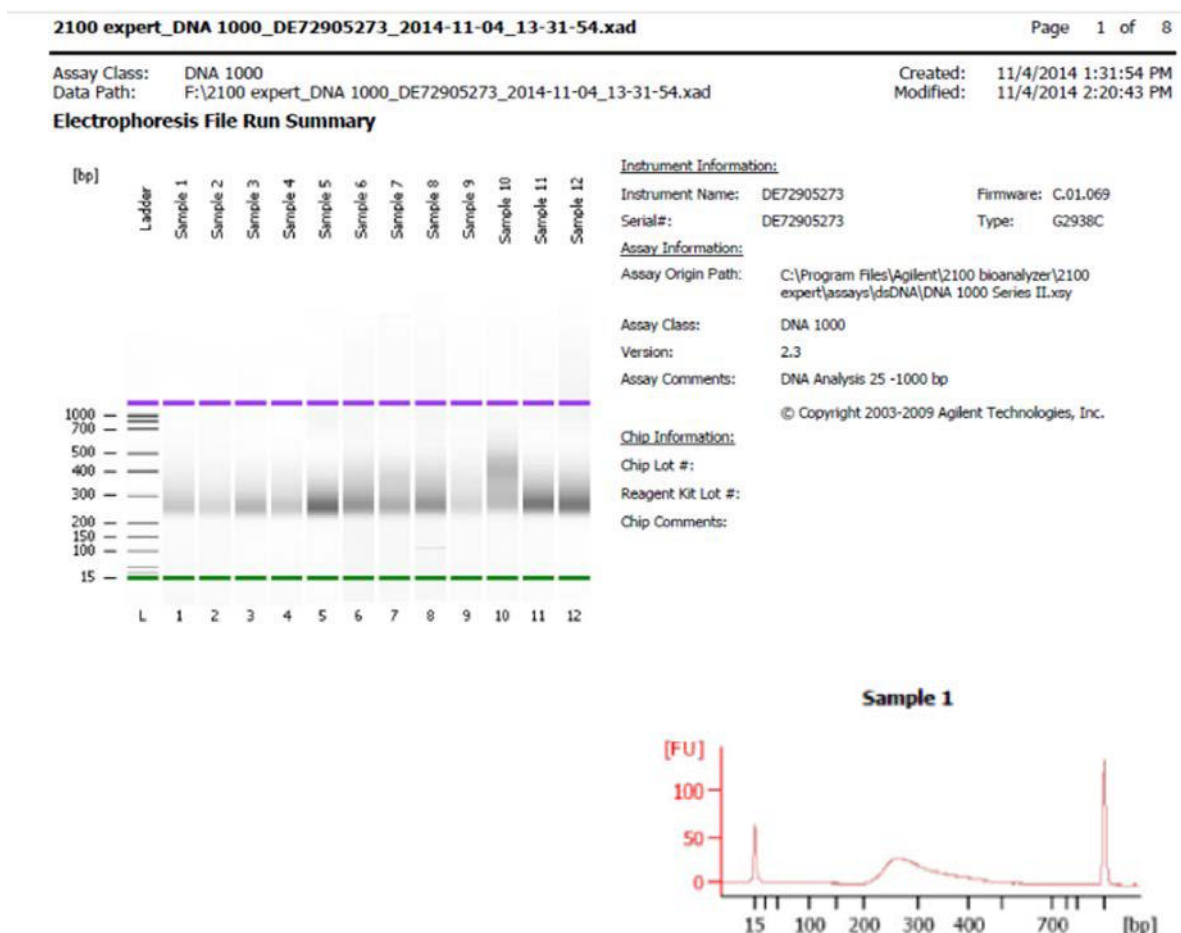


Figura 4: Perfil de 12 bibliotecas de cDNA exibido pelos gráficos resultantes do Bioanalyzer 2100. Em detalhe, o perfil de distribuição dos fragmentos amplificados para a biblioteca 1.

A quantificação das bibliotecas por PCR em tempo real, cuja eficiência da reação ficou em 97,9%, foi utilizada para um cálculo acurado da quantidade de cada biblioteca a ser utilizada para o sequenciamento.

Utilizando-se os primers específicos para os adaptadores acoplados a cada sequência da biblioteca, foi possível estimar a concentração de cada amostra utilizando a técnica de qPCR. Foram feitas diluições seriadas das amostras, até chegar a uma diluição de 200.000 vezes para todas as bibliotecas. A reação do kit KAPA já contém os primers que se ligam nos adaptadores das amostras, então foi utilizado 6µL da reação + 4µL de cada biblioteca diluída 200.000 vezes.

A partir dos valores de Ct (cycle threshold values) dos padrões foi estimada a curva de diluição conforme demonstrado na Figura 5. Foi aplicada a fórmula logarítmica da curva padrão para determinar a concentração das amostras a partir do Ct. A concentração estimada a partir da fórmula foi corrigida para o tamanho estimado dos fragmentos, levando em consideração que o tamanho dos fragmentos do padrão de concentração do kit KAPA é 452, multiplicando o valor encontrado por 452/300.

O tamanho dos fragmentos foi estimado com base no perfil de cada amostra verificado pelo equipamento Bioanalyzer 2100, cujos fragmentos ficaram em torno de 260 pb e com base na eletroforese em gel de agarose 1,5%, onde os fragmentos ficaram em torno de 400 pb. Desta forma, foi considerado um tamanho médio de 300 pb, levando-se em conta que a eletroforese em gel de agarose é tem menos resolução e sensibilidade que o equipamento Bioanalyzer 2100.

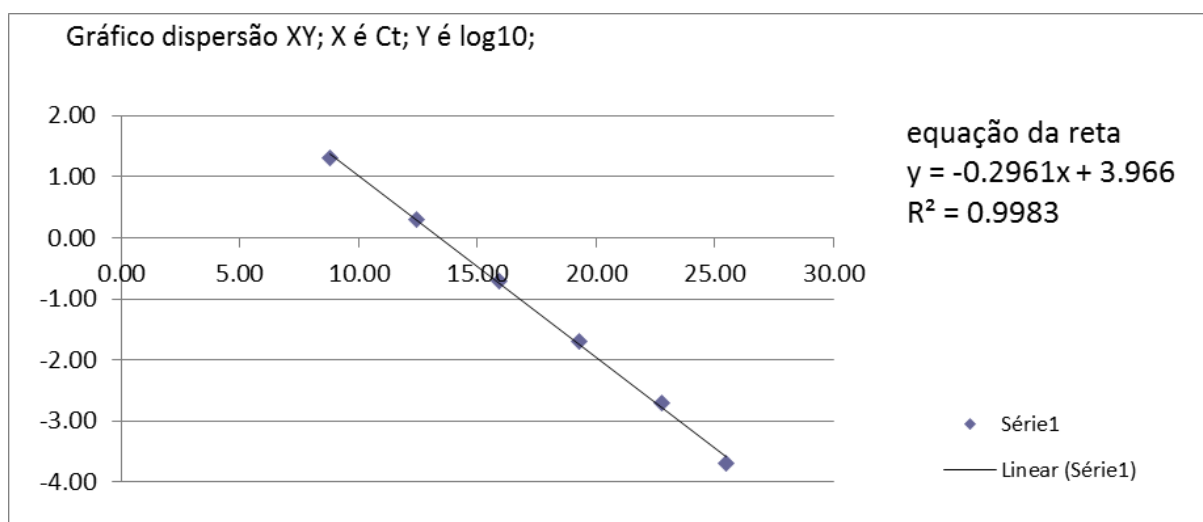


Figura 5: Gráfico da com a curva de diluição baseada dos padrões do kit KAPA, contendo a fórmula para determinar a concentração das amostras a partir do Ct. A fórmula logarítmica (y) a partir dos padrões foi usada para determinar a concentração (em pM) das amostras pelo cálculo  $=10 \times [(-0.2961 \times \text{média\_dos\_Cts}) + 3.966]$ .

Tabela 2: Cts obtidos para os padrões do kit KAPA Library Quantification Kit Illumina.

Posição	Amostr a	Ct	Média Ct	[ ]	log10
A1	STD1	9.05	8.77	20.0000	1.30
A2	STD1		8.49	20.0000	
A3	STD2	12.64	12.43	2.0000	0.30
A4	STD2		12.22	2.0000	
A5	STD3	16.07	15.91	0.2000	-0.70
A6	STD3		15.75	0.2000	
A7	STD4	19.32	19.28	0.0200	-1.70
A8	STD4		19.25	0.0200	
A9	STD5	22.67	22.78	0.0020	-2.70
A10	STD5		22.90	0.0020	



A11	STD6	25.59	25.48	0.0002	-3.70
A12	STD6		25.38	0.0002	

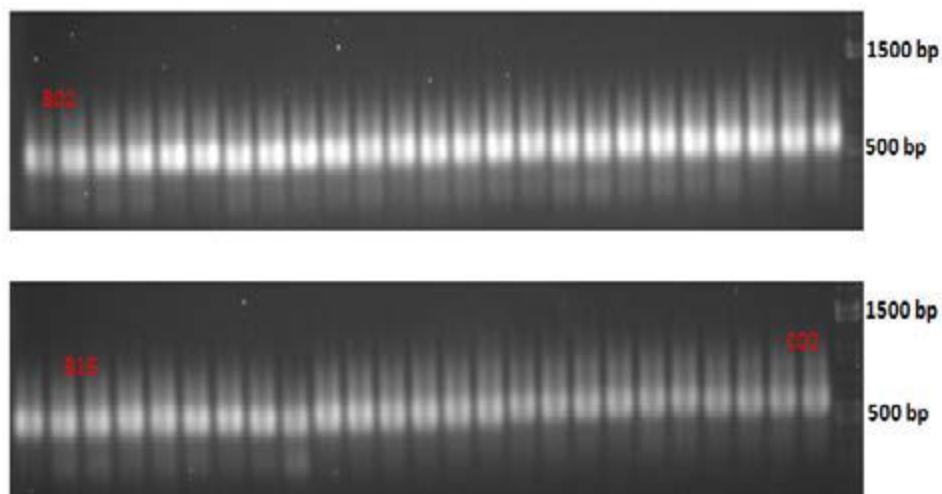


Figura 6: Gel de agarose 1,5% ilustrando os fragmentos obtidos a partir de cDNA após a PCR em tempo real. Através do ladder, pode-se estimar que as bibliotecas tem aproximadamente 400 pb.

### 5.3. Sequenciamento Automático

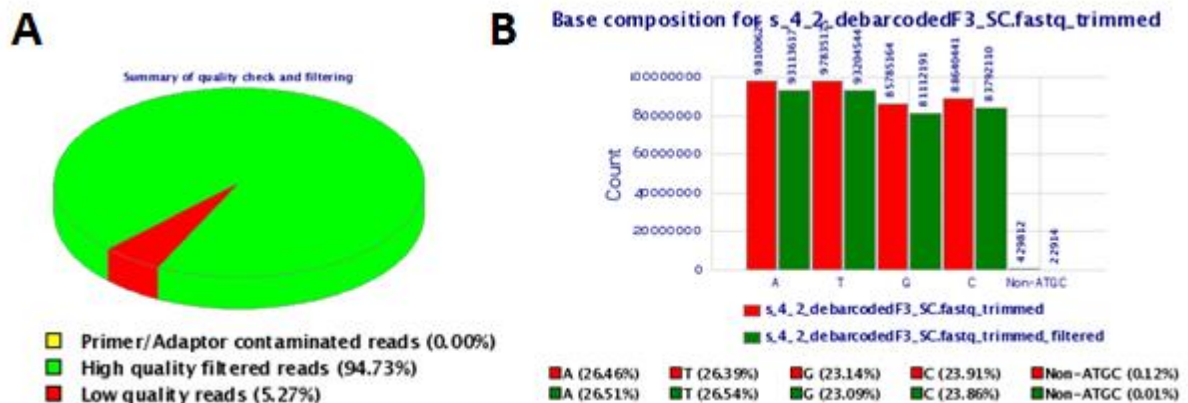
Para cada biblioteca foi realizado sequenciamento na plataforma Illumina Genome Analyzer IIx (GAIIx), com sequências paired-end de 72 pb.

### 5.4. Trimagem das sequências obtidas

A demultiplexagem dos indivíduos de cada lane foi feita por script Perl customizado e, a remoção dos adaptadores das sequências brutas e a seleção de reads com Qscore >20 foi feita com a ferramenta NGS QC Toolkit (Patel R. K. & Jain M., 2012). Após a seleção dos reads com Q>20, aproximadamente 8% das sequências foram perdidas (Tabela 3), obtendo-se 317.117.092 reads utilizadas na montagem *de novo*. Os dados filtrados do sequenciamento apresentaram, portanto quality score (Qscore) acima de 20. Essa pontuação de qualidade atribuída a cada base adicionada na leitura da sequência, segue uma métrica comumente usada para avaliar a precisão de um sequenciamento (Phred).

**Tabela 3:** Número bruto de reads e o número final após a trimar as sequências em cada amostra. As amostras foram nomeadas de acordo com o número do indivíduo utilizado, sendo utilizado os indivíduos 1, 4 e 5 do Pará (Amostra1, Amostra4, Amostra5 PA) e os indivíduos 2, 3, 4 de Santa Catarina (Amostra2, Amostra3, Amostra4 SC).

<b>Folha1 PA</b>	<b>Folha2 SC</b>	<b>Folha3 SC</b>	<b>Folha4 SC</b>	<b>Folha4 PA</b>	<b>Folha5 PA</b>
n° reads (dados brutos )	12.439.574	12.085.412	10.299.756	20.313.822	12.935.192
n° reads (Q>20)	11.809.314	11.458.510	9.756.816	18.971.842	11.836.580
<b>Raiz1 PA</b>	<b>Raiz2 SC</b>	<b>Raiz3 SC</b>	<b>Raiz4 SC</b>	<b>Raiz4 PA</b>	<b>Raiz5 PA</b>
n° reads (dados brutos )	12.794.912	14.294.912	10.764.394	11.385.944	15.772.006
n° reads (Q>20)	11.901.462	13.006.484	9.296.568	10.163.032	14.330.550
<b>Flor1 PA</b>	<b>Flor2 SC</b>	<b>Flor3 SC</b>	<b>Flor4 SC</b>	<b>Flor4 PA</b>	<b>Flor5 PA</b>
n° reads (dados brutos )	12.094.840	11.351.412	10.395.910	11.652.404	12.839.744
n° reads (Q>20)	11.249.976	10.513.788	9.906.282	10.727.130	11.987.402
<b>Caule1 PA</b>	<b>Caule2 SC</b>	<b>Caule3 SC</b>	<b>Caule4 SC</b>	<b>Caule4 PA</b>	<b>Caule5 PA</b>
n° reads (dados brutos )	6.688.882	9.173.086	10.644.098	25.718.872	7.325.334
n° reads (Q>20)	5.853.300	8.499.948	10.176.912	24.127.306	6.354.120
<b>Meristema1 PA</b>	<b>Meristema2 SC</b>	<b>Meristema3 SC</b>	<b>Meristema4 SC</b>	<b>Meristema4 PA</b>	<b>Meristema5 PA</b>
n° reads (dados brutos )	4.384.804	13.377.038	9.009.008	8.910.026	3.517.384
n° reads (Q>20)	4.158.636	12.856.222	8.203.986	8.271.660	3.370.308



**Figura 7:** Gráfico ilustrando a porcentagem de reads com q>20 (94,73%) aproveitadas para a montagem, e as reads eliminadas da sequência por qualidade baixa (5,27%). B) Gráfico demonstrando a quantidade de cada base nucleotídica que compõem as sequências, tanto nas sequências brutas (barras vermelhas), quanto nas sequências filtradas por q>20 (barras verdes), podendo-se observar que não há grandes perdas de sequências e nem há variações nas porcentagens de cada base entre as sequências trimadas e não trimadas.

O gráfico seguinte (Figura 7) ilustra uma análise de qualidade dos dados brutos e dos filtrados por qualidade q>20 de uma corrida de RNA-Seq segundo a tabela phred. A maioria dos reads apresenta qualidade superior a 39.

### 5.5. Enriquecimento dos Genes únicos em cada população:

Foi feita uma análise de enriquecimento de categorias funcionais (GO terms) para as sequências únicas (que só estão presentes em uma das populações) anotadas em cada tecido através do Programa GSeq (Young et al., 2010). A partir dos Go terms enriquecidos ( $pvalue < 0,05$ ) no conjunto dos genes únicos com nível de expressão maior que 5 FPKM, foi feito um gráfico que apresenta um resumo dos resultados de enriquecimento de Gene Ontology, resumizando a complexidade dos dados em padrões, utilizando o programa Treemap (Baehrecke et al., 2004).

### **FOLHA:**

Um total de 5971 genes únicos do Pará foram analisados e 229 termos associados a esses genes foram considerados enriquecidos ( $pvalue < 0,05$ ). A partir do gráfico gerado pelo Treemap, baseado na ontologia dos genes enriquecidos no conjunto dos genes únicos de folha, foi identificado um grupo de transcritos com função associada ao “phosphorelay signal transduction system” (204 genes expressando valores significativos) e um grupo associado ao GO: “phosphorelay signal transduction system”, ao GO “proteolysis” (328 transcritos associados diretamente ao GO “metabolism e methylation”).

Em folhas de Santa Catarina foram enriquecidos 73 categorias dentre os 2715 genes únicos da região. O gráfico obtido pelo programa Treemap exibiu que os GO terms mais abundantes entre os genes únicos de SC foram: “regulation of catalytic activity”; “protein arginylation”; “mRNA polydenylation”; “root hair cell development”; “defense to cold”; “UDP-glucose transport”; “inositol trisphosphate metabolism”.

É possível observar uma alta expressão de dez genes pertencentes ao GO (GO:0008312 de 7S RNA binding), já descrito por desempenhar papel importante no crescimento de plântulas em baixas temperaturas e conferem tolerância ao congelamento em plantas de Arabidopsis e arroz (Kim et al., 2007a, 2008a, Kwak et al., 2005).

Foram encontrados 42 transcritos pertencentes à função GO “chloroplast relocation”, 132 pertencentes ao componente celular “chloroplast stroma” e 33 de “chloroplast thylakoid”, que podem estar ligados ao processo de senescência de folhas por estresse abiótico, seja por estresse oxidativo ou estresse por luminosidade (Xie Q et al., 2015).

### **FLOR**

Dentre os 6908 genes únicos de flor no Pará, 417 estavam presentes nas categorias enriquecidas. O gráfico contruído pelo Treemap demonstrou abundância de GO terms relacionados às categorias “protein farnesylation; 5-phosphoribose 1-diphosphate biosynthesis”; “organic phosphonate transport”; “cellular response to starvation”; “cytochrome complex assembly”; “regultaion of cell proliferation”; “cellular iron ion homeostasis”.

Já entre os 4592 genes únicos de Santa Catarina, 112 perteciam as categorarias enriquecidas. O gráfico contruído com o programa Treemap, a partir dos transcritos únicos de SC, mostraram abundância de GOs relacionados a “uridine catabolism”, “ATP transport”; “abaxial cell fate specification”; “cellular response to glucose starvation”; “actin filament-based movement”; “translational frameshifting”.

### **CAULE**

Dentre os 1961 genes únicos de caule do Pará, foram encontrados 64 genes entre as categorias enriquecidas. O gráfico elaborado com o programa Treemap, da contagem de GOterms enriquecidos nos transcritos únicos de caule, demonstrou maior representatividade dos seguintes GOs: “response to ammonium ion”; “chlorophyll catabolism”; “ER to Golgi vesicle-mediated transport”; “maintenance od DNA methylation”; “seed germination”; “starch metabolism”; “negative regulaion of programmed cell death”. “Negative regulation of programmed cell death” foi o GO term mais enriquecido na rede de caule, e se conferidos os valores de expressão de 16 genes únicos diretamente relacionados ao GO: “negative regulation of programmed cell death” , iremos encontrar valores altos de FPKM.

Nas amostras de Santa Catarina, 5501 genes únicos foram analisados e 112 foram encontrados entre as categorias de GO terms enriquecidas. O gráfico obtido através do programa Treemap, a partir dos transcritos únicos de caule em SC agrupou os GO terms mais representativos em 10 categorias hierárquicas de alto nível: “enzyme active site formation via L-cysteine persulfide”; “plant-type secondary cell wall biogenesis”; “toxin catabolism”; “response to arsenic-containing substance”; “regutation of pH”; “abaxial cell fate specification”; “cholesterol transport”; “sexual reproduction”, “fruit dehiscence”, “xylulose metabolism”.

### **RAIZ**

Dentre os 4739 genes únicos de raiz no Para, 108 genes estão presentes nas categorias enriquecidas. O gráfico gerado pelo programa Treemap, do enriquecimento das categorias às quais pertencem os genes únicos no PA mostrou abundância dos GO terms envolvidos com “protein–chromophore linkage”; “positive regulation of auxin metabolism”; “ribosomal small subunit”; “toxin catabolism”; “primary root development” ; “protein targeting to vacuole”; “response to cytokinin” ; “photosynthesis”; “flavonoid biosynthesis”; “photosynthesis light harvesting”; “G1/S transition of mitotic cell cycle”; “sulfate reduction”.

Em Santa Catarina foram analisados 3507 genes únicos e também foram enriquecidos 108 genes dentre as categorias. O Programa Treemap revelou maior abundância de GO terms aos quais pertencem os transcritos únicos em: “regulation of hydrogen peroxide metabolism”; “citrate transport”; “suspensor development”; “macromolecule depalmitoylation”; “N-acylethanolamine metabolism”; “cellular response to high light intensity”; “D-xylose metabolism”; “cortical microtubule organization”; “phosphatidylinositol dephosphorylation”; “mRNA polyadenylation”.

### **MERISTEMA**

Dentre os 2170 genes únicos do Para, 92 pertencem a categorias enriquecidas. O gráfico gerado pelo programa Treemap, dos transcritos únicos de meristema no Pará, agrupou os GO terms em categorias mais amplas, tais como: “detection of biotic stimulus”; “camalexin biosynthesis”; “tRNA export from nucleus”; “meristema structural organization”; “malonate catabolism”; “photosystem II assembly”; “protein ubiquitination”.

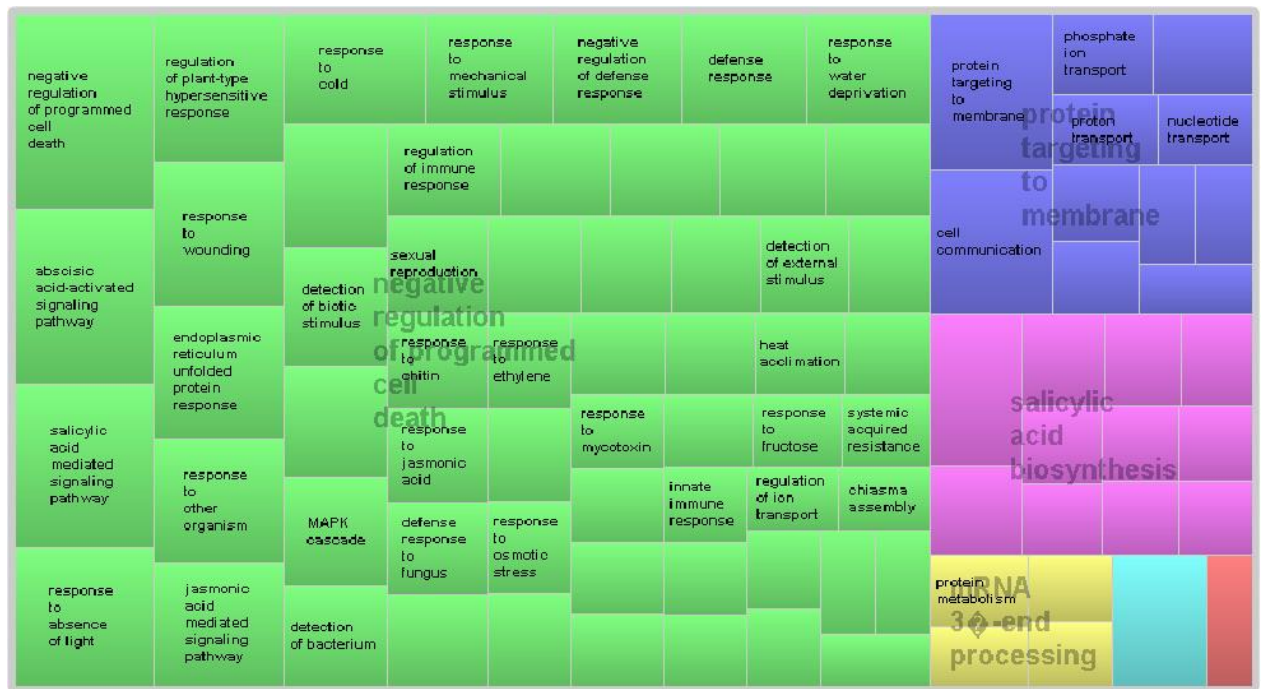
Em Santa Catarina, dentre os 6570 genes únicos, 443 foram pertenceram às categorias enriquecidas. Os GO Terms mais abundantes identificados pelo Treemap, elaborado a partir do conjunto dos transcritos únicos de meristema em SC, foram: “lipoprotein biosynthesis”; “organic phosphonate transport”; “regulation of nitrogen utilization”; “peroxisome organization”; “sulfate reduction”; “D-amino acid metabolism”; “FrsZ-dependent cytokinesis” .

## **5.6. Enriquecimento Rede**

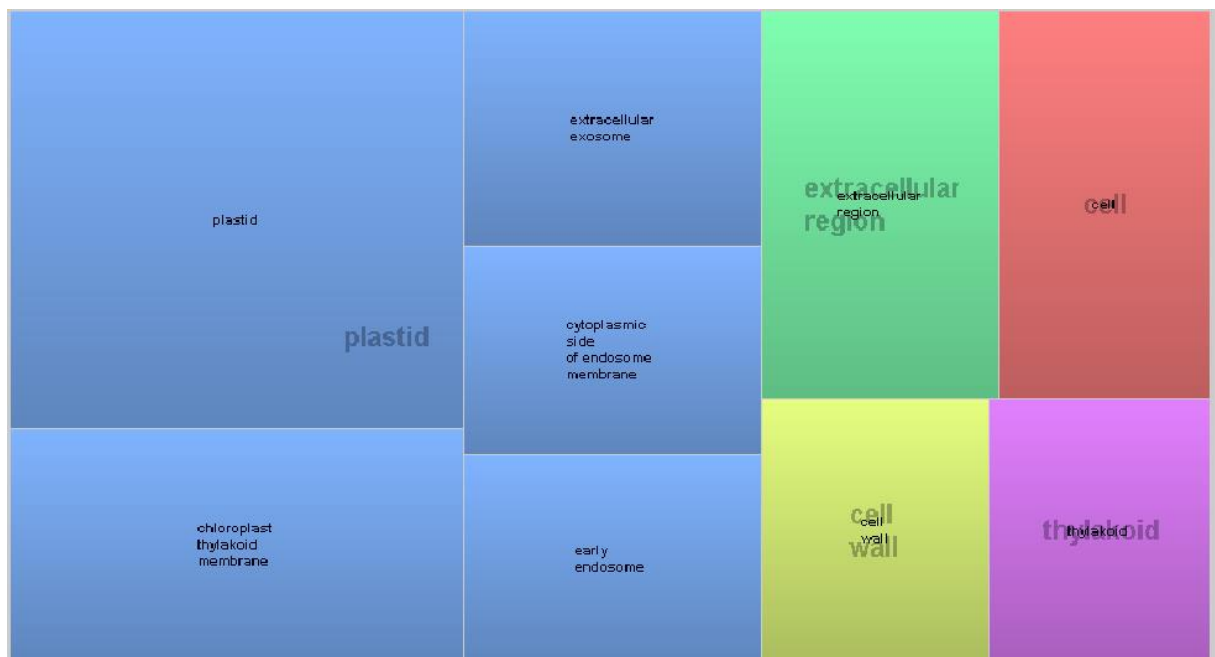
### **CAULE**

Na rede de caule, foram encontrados 149 GO terms enriquecidos, sendo 96 pertencentes a processos biológicos, 9 a componente celular, 44 a função molecular.

A maior parte dos GO terms de regulação negativa de morte celular programada está mais expressa ou exclusivamente expressa nas amostras da população Pará. Nas amostras de Santa Catarina, transcritos supostamente pertencentes a categorias de resposta a salinidade e de resposta a defesa a fungos foram significativamente ( $p\text{Value} < 0.01$ ) mais expressos em comparação às amostras da população do Pará.



**Figura 8: Treemap Caule, processo biológico**



**Figura 9: Treemap Caule, Componente Celular**



**Figura 10: Treemap Caule, Função Molecular**

Tanto em SC quanto no PA a categoria mais representada é de “negative regulation of programmed cell death”. Em SC, dentro desse grupo, há genes únicos envolvidos na resposta à privação de água, resposta de defesa contra fungos e de resposta a íons de metais. Na rede de interações gênicas elaborada a partir das amostras do Pará, observamos o enriquecimento de supostos genes envolvidos na biossíntese de ácido salicílico.

O gene único das amostras da população PA, anotado como “phospholipase D” é induzido por hormônios vegetais (auxin - IAA, gibberellins - GA, abscisic acid - ABA) ou por estresse abiótico (estresse salino e de seca) em uma espécie de arroz (Li G et al., 2007). Este gene único está diretamente correlacionado ao transcrito com maior expressão ( $p\text{Value} < 0.01$ ) nas amostras do Para, cuja anotação obtida foi “probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase”, envolvido em resposta ao estresse de maneira geral, como estresse osmótico e redução do potencial hídrico por conta do alto nível de sal (Whan Hong S et al., 1997).

Houveram poucos transcritos unicamente expressos nas amostras de SC que pertenceram às categorias enriquecidas. As categorias encontradas foram: GO de “response to water deprivation”, de “thermosensory behavior” (o que pode ser relacionado a temperatura

em SC que oscila mais que o PA, ainda mais no inverno onde as noites são frias e durante o dia faz sol e calor), de “probable serine/threonine-protein kinase WNK5” e “Thioredoxin” que respondem a estresse oxidativo e tolerância a salinidade.

Nas amostras do Pará um gene cuja expressão foi significativamente maior ( $p\text{Value} < 0.01$ ) que nas amostras de SC foi anotado com uma proteína “mitogen-activated protein kinase YODA (YDA)”, relacionada ao desenvolvimento epidérmico, o que provoca a ruptura da regra de espaçamento entre as células. As raízes atuam como sensores do déficit de água no solo, que é detectado pelas células-guarda dos estômatos mesmo antes de qualquer déficit hídrico ser observado nas folhas, por meio de sinais hormonais (ácido abscísico) enviados à parte aérea da planta (Salah & Tardieu 1997). A redução da condutância estomática diminui a perda de água das folhas e restringe a entrada de  $\text{CO}_2$  nestes órgãos, o que diminui a assimilação fotossintética de carbono. A importância da regulação da abertura dos estômatos como mecanismo de evitar a perda de água e permitir absorção de  $\text{CO}_2$  se deve à extrema sensibilidade desta estrutura, tanto ao estresse ambiental como a fatores fisiológicos internos. Quando a disponibilidade hídrica do solo é reduzida, os estômatos abrirão menos ou até mesmo permanecerão fechados, permitindo à planta evitar sua desidratação (Taiz & Zeiger 2004).

Dois transcritos cuja expressão foi maior nas amostras do Pará que nas de Santa Catarina foram anotados com uma provável proteína “phosphatase 2C”, correlacionada com o transcrito único das amostras do Para anotado como “SNF1”, um gene importante para respostas ao estresse e a processos de desenvolvimento em plantas. Um subgrupo de proteínas fosfatase 2C (grupo A PP2C) ou proteínas quinase 2 relacionada com SNF1 (subclasse III SnRK2) foram conhecidos como principais reguladores negativos ou positivos da sinalização por ABA, respectivamente (Umezawa T, et al; 2009). O gene único das amostras do Para, anotado como “proteína quinase 2” e correlacionado com o suposto SNF1, pode ser um regulador positivo da tolerância à seca em raízes (Umezawa, et al., 2004).

Um gene com maior expressão ( $p\text{Value} < 0.01$ ) nas amostras do PA diretamente correlacionado ao suposto SNF1 expresso unicamente nas amostras da mesma população, foi anotado com uma proteína “treonina sintase”, cuja expressão é induzida em situações de déficit hídrico em outros organismos. A abundância dessa proteína na via de biossíntese da treonina pode ser altamente induzida pelo déficit hídrico após um longo período de estresse (Cramer G et al., 2013).



Transcritos expressos tanto na rede das amostras de SC como na rede das amostras do PA estão correlacionados com a suposta “proteína quinase 2”, por sua vez correlacionada com o suposto “SNF1” e com o transcrito anotado como “CXXS1 - Thioredoxin-like protein”. Thioredoxins estão envolvidos nas respostas de estresse oxidativo em plantas por reparação de proteínas oxidativas (tais como proteína de ferro-enxofre e proteínas relacionadas ao reparo de danos no DNA), por indução da atividade de enzimas de proteção do sistema antioxidante (Broin et al., 2003; Martí et al., 2011) e por mecanismos ou vias de sinalização na rede antioxidante (Zhang et al., 2011).

Um transcrito único nas amostras do PA foi anotado como “ammonium transporter 2-like”. Esse gene desempenha diferentes funções fisiológicas na utilização de amônio, como redistribuição de amônio, por exemplo, realizando o transporte de amônio de raízes para brotos (Wu X et al., 2015).

Algumas categorias enriquecidas no conjunto dos transcritos únicos das amostras do Pará também foram enriquecidas no conjunto de transcritos da rede de caule, tais como: “response to other organis”; “regulation of multi-organism process”; “detection of biotic stimulus “protein serine/threonine phosphatase activity”, “systemic acquired resistance”, “salicylic acid mediated signaling pathway”; “regulation of ion transport”; “negative regulation of programmed cell death”. Esta última categoria pode também ser observada na figura 8, do enriquecimento de GO terms na rede de caule, gerada pelo programa Treemap, sendo ela a mais expressiva para essa rede.

Os GO terms enriquecidos no conjunto de genes únicos das amostras de Santa Catrina que também foram enriquecidos no conjunto de transcritos da rede foram: “innate immune response”; “heat shock protein binding”; “sexual reproduction”; “biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] ligase activity”.

Algumas das categorias funcionais enriquecidas no conjunto dos genes mais expressos ( $p\text{Value} < 0.01$ ) nas amostras do Pará em relação à Santa Catarina, também foram enriquecidas na rede de correlações intergênicas das amostras de caule, como por exemplo: “transcription factor activity”, “sequence-specific DNA binding”; “protein serine/threonine phosphatase activity”; “cation binding”; “transcription, DNA-templated”; “phosphoenolpyruvate carboxykinase activity”; “phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) activity”; “purine nucleotide binding”; “positive regulation of cell death”; “positive regulation of defense response”; “protein dephosphorylation”; “phosphoprotein phosphatase activity”; “response to

mycotoxin”; “regulation of response to red or far red light”; “detection of bacterium”; “regulation of immune response”; “response to absence of light”; “response to mechanical stimulus”; “cell”; “threonine biosynthetic process”; “MAPK cascade” e “regulation of defense response to virus by host”, sendo esta última também enriquecida nos genes mais expressos ( $p\text{Value} < 0.01$ ) nas amostras de folha do Pará em relação a Santa Catarina.

As categorias funcionais enriquecidas no conjunto dos transcritos com maior expressão ( $p\text{Value} < 0.01$ ) nas amostras de Santa Catarina que estavam também enriquecidas na rede de correlação entre os transcritos expressos em caule foram: “photoprotection”; “negative regulation of anion channel activity”; “response to metal ion”; “negative regulation of endopeptidase activity”; “cation binding”; “cell wall”; “phosphoenolpyruvate carboxykinase activity”; “phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) activity”; “purine nucleotide binding”; “protein serine/threonine phosphatase activity”; “phosphoprotein phosphatase activity”; “ethylene receptor activity”; “ethylene binding”; “extracellular region”; “negative regulation of ethylene-activated signaling pathway”; “protein histidine kinase activity”; “peptidyl-histidine phosphorylation”; “hyperosmotic salinity response”; “protein dephosphorylation”.

Com o calor, as plantas geralmente ficam mais suscetíveis a ataques de fungos e aumentam sua vulnerabilidade a outros tipos de doenças. Como no Pará a temperatura é constantemente alta e as plantas de lá devem constantemente estar respondendo a esse tipo de estresse. Frente às previsões de aumento da temperatura atmosférica, as plantas dessa região podem estar mais preparadas para lidar com esse fator de estresse do que as plantas de Santa Catarina, onde este mecanismo é menos exigido por conta da temperatura ocilar e se manter mais amena.

## **RAIZ**

Na rede de raiz foram identificadas 106 categorias funcionais enriquecidas, das quais 50 são de processos biológicos, 13 de componentes celulares e 42 de funções moleculares.

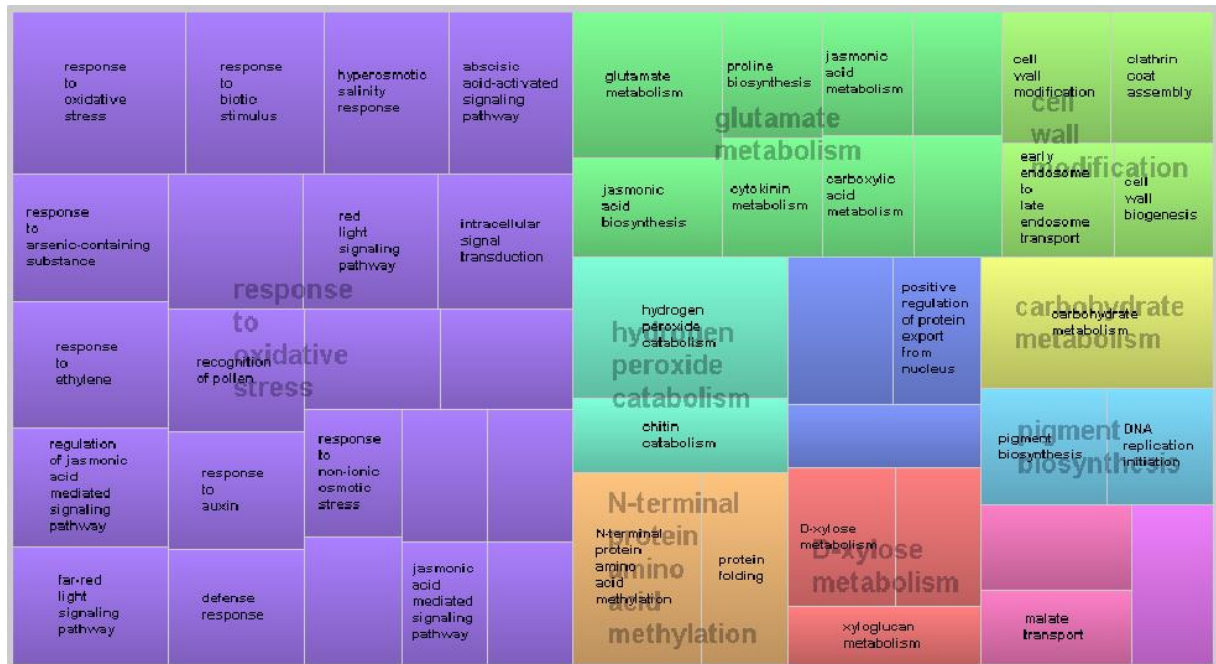


Figura 11: Treemap raiz, processo biológico.

A rede de correlação da expressão entre os transcritos diferencialmente expressos e únicos das amostras de SC apresentaram maior representatividade de categorias funcionais de “response to oxidative stress”, “carbohydrate metabolic process” e “N-terminal protein amino acid methylation”, enquanto a rede com os transcritos diferencialmente expressos e únicos das amostras do Pará foi bem variada.



Figura 12: Tree map raiz, componente celular:



**Figura 13: Treemap raiz, Função molecular**

Ao compararmos as categorias funcionais enriquecidas no conjunto de genes únicos das amostras do Pará com e no conjunto dos genes da rede de raiz, encontramos algumas categorias em comum, como: “extracellular region”; “glutamate decarboxylase activity”; “catalytic activity”; “clathrin binding”; “cellular glucan metabolic process”; “xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity”; “cell wall biogenesis”; “nuclear chromosome”; “xyloglucan metabolic process”; “xyloglucan endotransglucosylase activity”.

Já na comparação entre as categorias enriquecidas no conjunto dos genes únicos de Santa Catarina e na rede de raiz, foram encontrados outros GO terms compartilhado: “3-dehydroquinate synthase activity”; “D-xylose metabolic process”; “Hrd1p ubiquitin ligase complex”; “ubiquitin protein ligase activity”; “ER-associated ubiquitin-dependent protein catabolic process”; “cytokinin metabolic process”; “nucleolus”; “photoperiodism, flowering”.

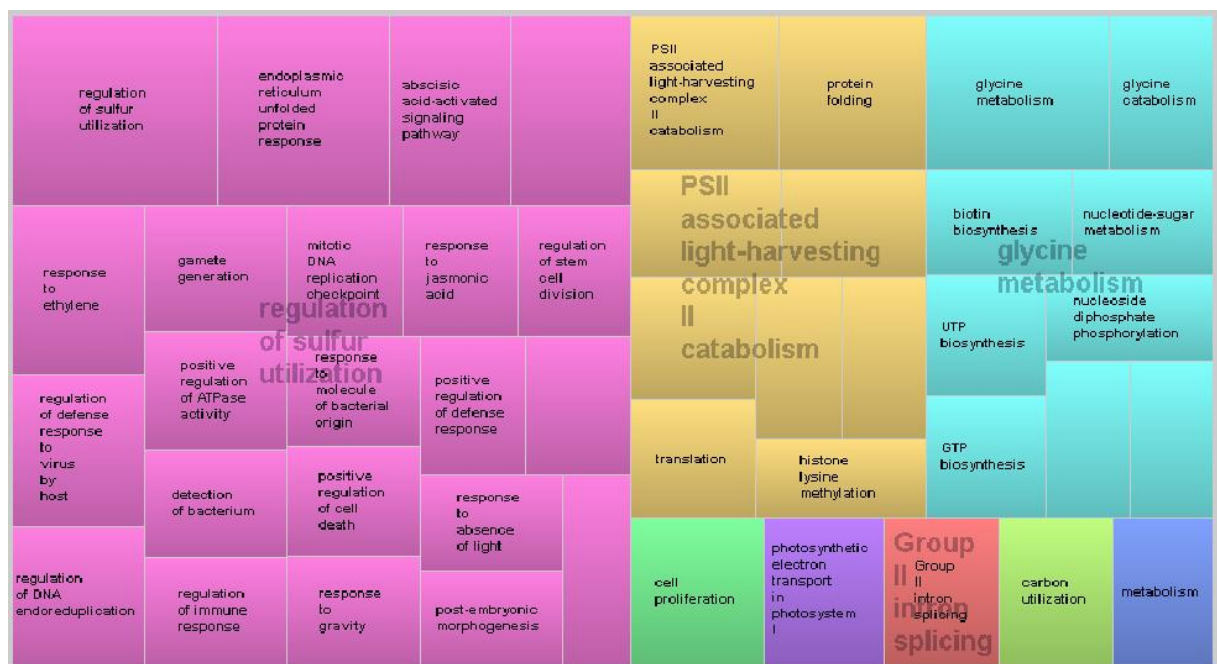
Entre os genes significativamente mais expressos ( $p\text{Value} < 0.01$ ) nas amostras do Pará, as categorias que também foram enriquecidas no conjunto dos transcritos da rede de raiz foram: “extracellular region” (termo também enriquecido entre os genes únicos do Pará); “catechol oxidase activity”; “pigment biosynthetic process”; “heme binding”; “hydrogen peroxide catabolic process”; “response to oxidative stress”; “peroxidase activity”; “cellular oxidant detoxification”; “nutrient reservoir activity”; “proton-transporting V-type ATPase, V0

domain”; “chitinase activity”; “chitin catabolic process”; “recognition of pollen”; “pectinesterase activity”; “aspartyl esterase activity”.

Entre os genes diferencialmente expressos entre as populações estudadas ( $p\text{Value} < 0.01$ ) e com maior expressão em Santa Catarina, as categorias funcionais enriquecidas que também apresentaram enriquecimento nos genes da rede de raiz, foram: “nutrient reservoir activity”, GO term também enriquecido entre os transcritos com maior expressão nas amostras do Pará, mas que são representados por genes distintos; “proline biosynthetic process” “beta-amylase activity”.

## **FOLHA**

Na rede de folha foram encontrados 83 GOterms enriquecidos, dos quais 47 pertencem a processos biológicos, 11 a componentes celulares e 25 a função molecular.



**Figura 14: Treemap folha, processo biológico**

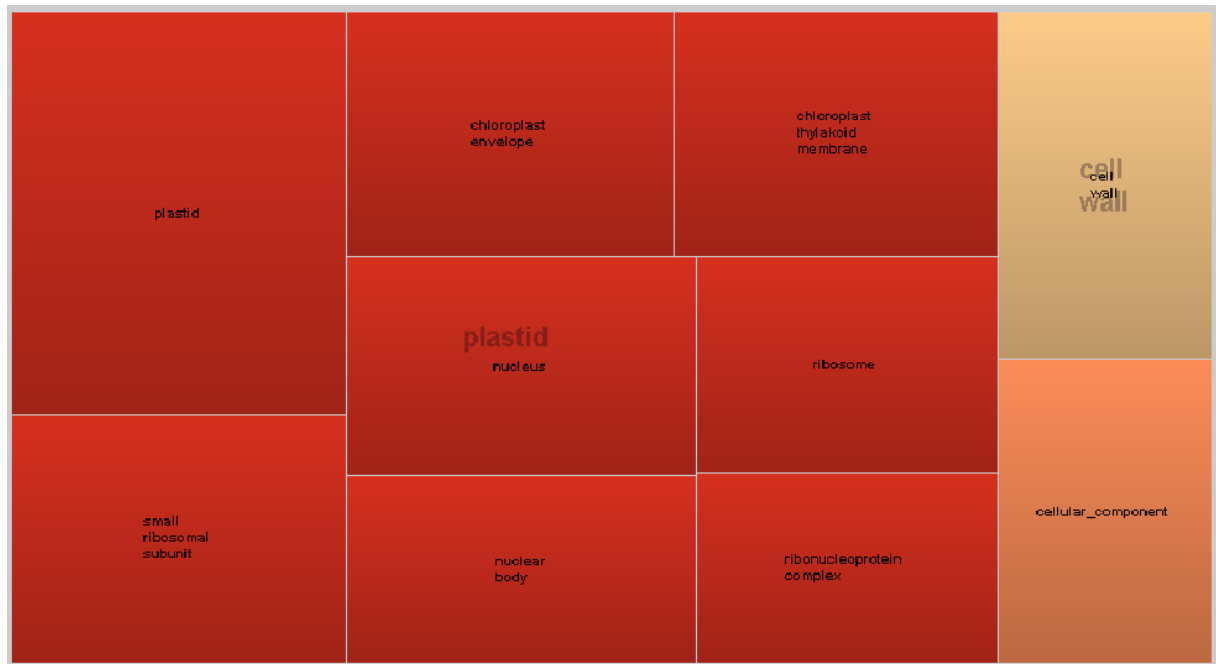


Figura 15: Treemap folha, componente celular.



Figura 16: Treemap folha, função molecular

Quando comparados os Go terms enriquecidos no conjunto dos genes únicos das amostras do Pará com o GO terms enriquecidos na rede de co-expressão de folha, observamos algumas categorias em comum, como: “transferase activity, transferring acyl groups other

than amino-acyl groups”; “thiolester hydrolase activity”; “catalytic activity”; “metabolic process”; “translation”.

Entre as categorias enriquecidas no conjunto dos genes únicos de Santa Catarina e as categorias enriquecidas na rede de folha observamos os seguintes GO terms compartilhados: “chloroplast thylakoid” e “abscisic acid-activated signaling pathway”, contendo transcritos responsivos ao estresse osmótico (Rosado et al., 2006).

A análise de enriquecimento das categorias funcionais no conjunto dos genes mais expressos nas amostras do Pará em relação às de Santa Catarina revelou algumas categorias em comum com as enriquecidas entre os transcritos da rede de folha, como: “dTDP-glucose 4,6-dehydratase activity”; “nucleotide-sugar metabolic process”; “regulation of defense response to virus by host”; “regulation of immune response”; “response to absence of light”, que esta presente entre os grupo mais representativo da rede de folha (cluster 17); “thiolester hydrolase activity”; “regulation of DNA endoreduplication”; “gamete generation”; “deaminase activity”.

Os termos enriquecidos entre os genes com maior expressão nas amostras de Santa Catarina que foram compartilhados com os termos enriquecidos na rede de folha foram: “magnesium-importing ATPase activity”; “Group II intron splicing”; “2 iron, 2 sulfur cluster binding”; “hydrolase activity, acting on ester bonds”.

## **FLOR**

Na rede de flor foram encontrados 156 termos enriquecidos, dos quais 71 pertencem a processo biológico, 28 a componente celular e 57 a função molecular.

Nas amostras de flor foram encontrados mais termos enriquecidos do tipo componente celular do que nas amostras dos demais tecidos. Flor é o tecido cuja análise de enriquecimento apresentou maior diversidade de GO terms na rede formada pelos transcritos diferencialmente expressos e únicos das amostras do Pará, bem como na de Santa Catarina, mostrando uma maior complexidade estrutural, funcional e metabólica nesse órgão.



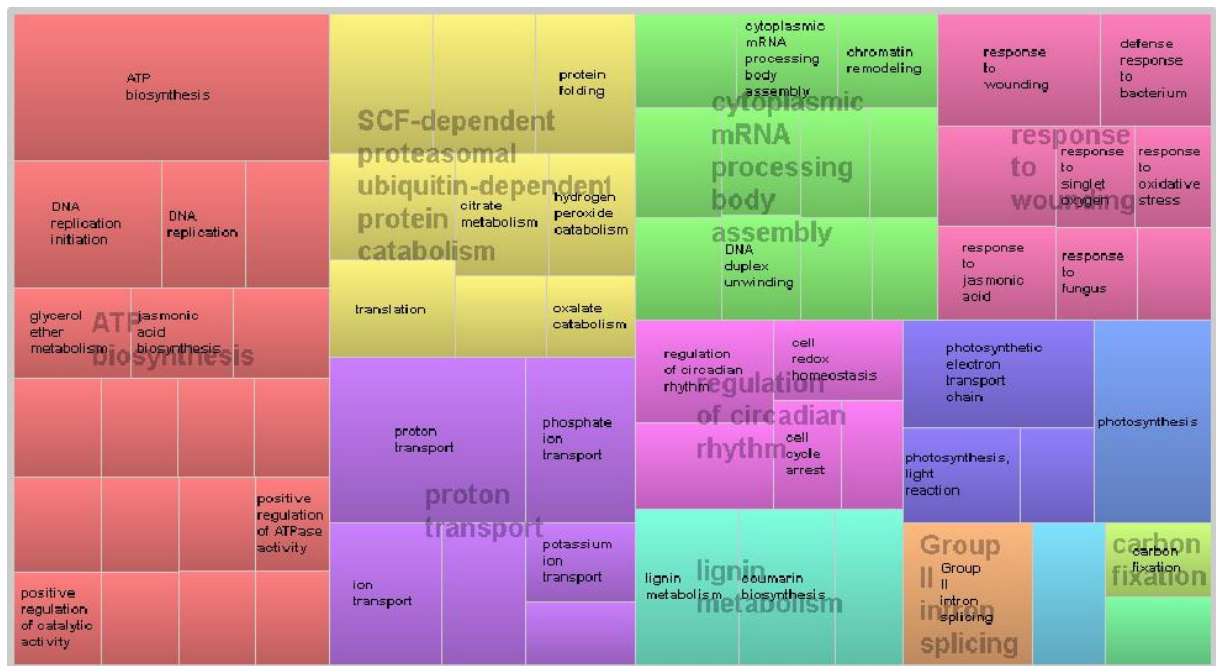


Figura 17: Treemap flor, processo biológico

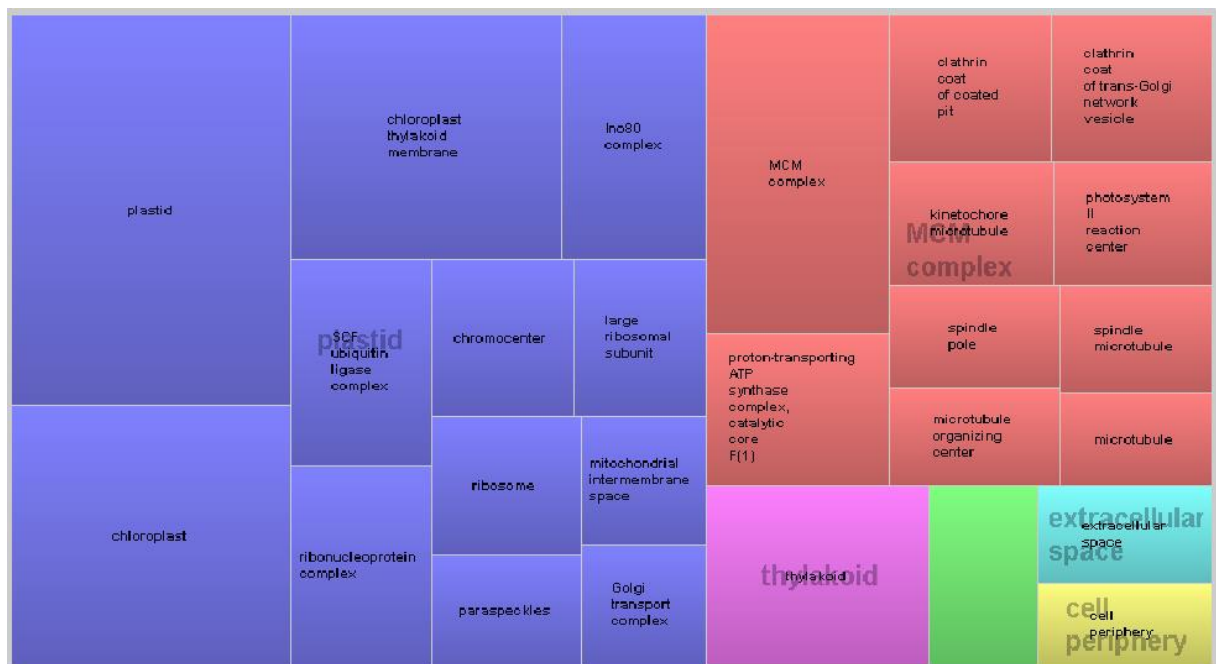
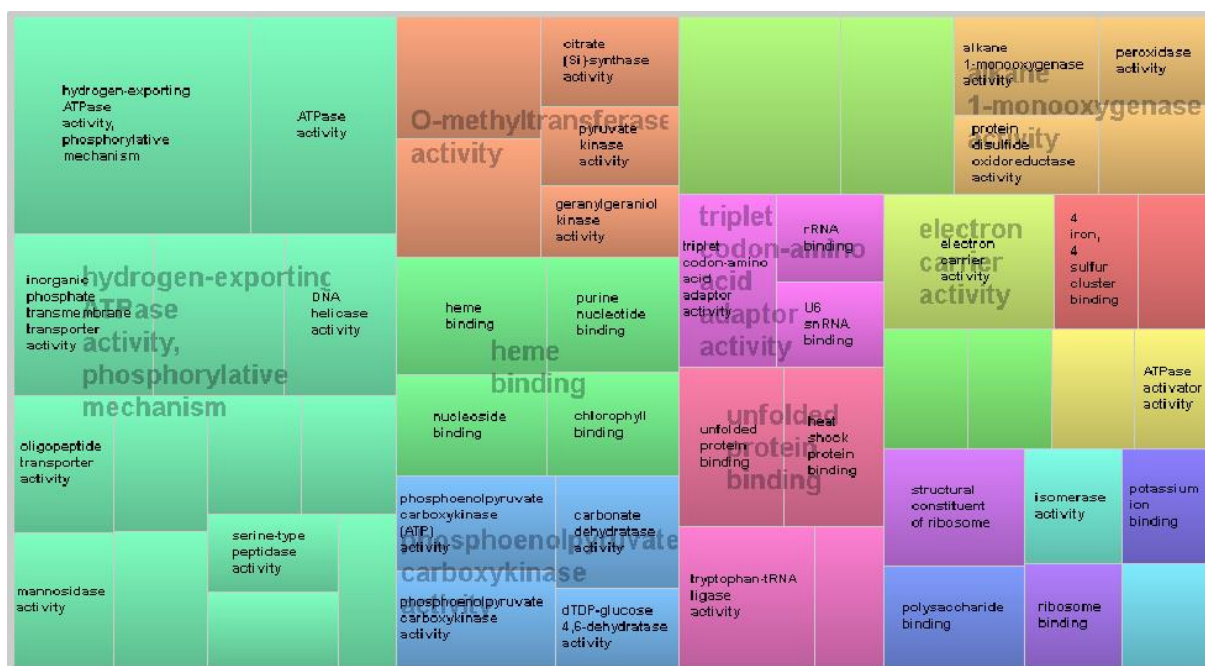


Figura 18: Treemap flor, componente celular





**Figura 19: Treemap flor, função molecular**

As categorias enriquecidas na rede de flor que foram também enriquecidas entre os genes únicos do Pará foram: “ATPase activity”; “triplet codon-amino acid adaptor activity”; “translation”; “DNA replication”; “oxidation-reduction process”; “potassium ion transport”; “4 iron, 4 sulfur cluster binding”; “isomerase activity”; “DNA duplex unwinding”; “extracellular space”; “DNA unwinding involved in DNA replication”; “iron-sulfur cluster binding”; “oxidoreductase activity”; “sodium:dicarboxylate symporter activity”.

Os termos enriquecidos na rede de flor em comum com os termos enriquecidos no conjunto dos genes únicos de Santa Catarina foram: “ribosome”; “structural constituent of ribosome”; “translation”; “intracellular ribonucleoprotein complex”; “hydrogen ion transmembrane transport”; “heme binding”; “peroxidase activity”; “oxalate catabolic process”; “oxalate-CoA ligase activity”; “cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitor activity”; “cell cycle arrest”; “negative regulation of protein serine/threonine kinase activity”.

Os termos enriquecidos tanto na rede de flor quanto nos genes diferencialmente expressos com maior expressão nas amostras do Pará foram: “photosynthesis”; “photosynthetic electron transport in photosystem II”; “photosynthesis, light reaction”; “electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of

photosynthesis activity”; “carbonate dehydratase activity”; “chloroplast thylakoid membrane”; “response to oxidative stress”; “chlorophyll binding”; “protein-chromophore linkage”; “electron carrier activity”; “isomerase activity”; “photosystem II”; “triplet codon-amino acid adaptor activity”; “plastid”; “glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase activity”; “photosynthetic electron transport chain”; “hydrogen peroxide catabolic process”; “thylakoid”; “inflorescence morphogenesis” ; “mannose metabolic process”; “mannosidase activity”; “phosphate ion transport”.

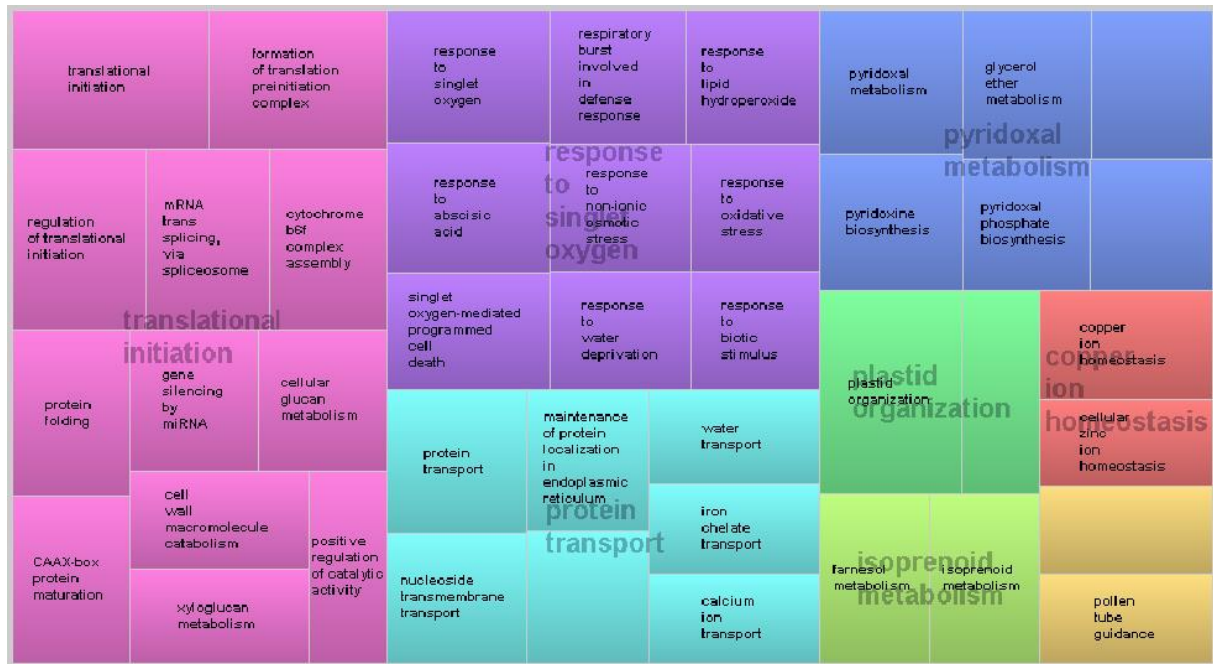
Os termos enriquecidos entre os genes diferencialmente expressos com maior expressão nas amostras de Santa Catrina, que também foram enriquecidos na rede de flor são: “response to red or far red light”; “fructose 1,6-bisphosphate metabolic process”; “hydrogen peroxide catabolic process”; “MCM complex”; “ATP-dependent chromatin remodeling”; “ATPase activity”; “ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances”; “Golgi transport complex”; “mannose metabolic process”; “mannosidase activity”; “DNA replication”; “alpha-mannosidase activity”; “DNA helicase activity”.

A floração é diretamente influenciada pela fenologia, onde a taxa de desenvolvimento das flores respondem fortemente a alterações na temperatura e no fotoperíodo (Craufurd and Wheeler, 2009). Além das características específicas de temperatura/pluviosidade/gases atmosféricos em cada uma das regiões norte e sul, estas regiões estão enfrentando modificações climáticas frequentes como secas anuais, o que pode estar executando uma grande pressão para o desenvolvimento destas plantas, desencadeando uma cadeia de respostas complexas, com expressão de genes de regulação de nutrientes, crescimento e etc . Deste modo, é esperado que este tecido apresenta respostas únicas, uma vez que é muito relevante para a planta investir na sua floração para iniciar o seu período reprodutivo.

O momento da floração, um estágio crítico de desenvolvimento no ciclo de vida da maioria das plantas, quando o número máximo de sementes possíveis é determinado, é importante para a adaptação às pressões seletivas abióticas provocada por temperaturas extremas ou déficit hídrico e às pressões bióticas (pragas e doenças) (Curtis, 1968) dentro da estação de crescimento.

### **MERISTEMA**

Na rede de meristema foram encontrados 77 Goterms enriquecidos, dos quais 42 estão em processo biológico, 8 em componente celular e 27 em função molecular.



**Figura 20: Treemap meristema, processo biológico**

Tanto na rede com os transcritos com maior expressão ou expressão única nas amostras do Pará, quanto na rede com os transcritos com maior expressão ou expressão única nas amostras de Santa Catarina, os GO term mais representativos foram protein transport e translational initiation (dentro do qual há muitos transcritos diretamente anotados pelo GO term “gene silencing by miRNA”). É notável que as redes em ambos os lugares estão destinando esforços para silenciamento, mas com maior intensidade e quantidade na rede do Pará. O meristema se caracteriza portanto por formar uma rede reguladora cuja mediação por miRNAs é expressivamente enriquecida. Os vários estímulos ambientais e estresse externo, incluindo resposta a vírus, seca, salinidade e metais pesados no ambiente desencadeia mecanismos eficientes para que as plantas possam se defender através de um conjunto significativo de miRNAs. Muitos desses miRNA, são em grande parte conservado em mais de uma plantas, e podem estar associados com características particulares, ou envolvidos em características múltiplas (Zheng & Qu et al., 2015). A maioria dos miRNAs de resposta ao estresse são conservados e têm um efeito semelhante entre arroz e outras plantas.

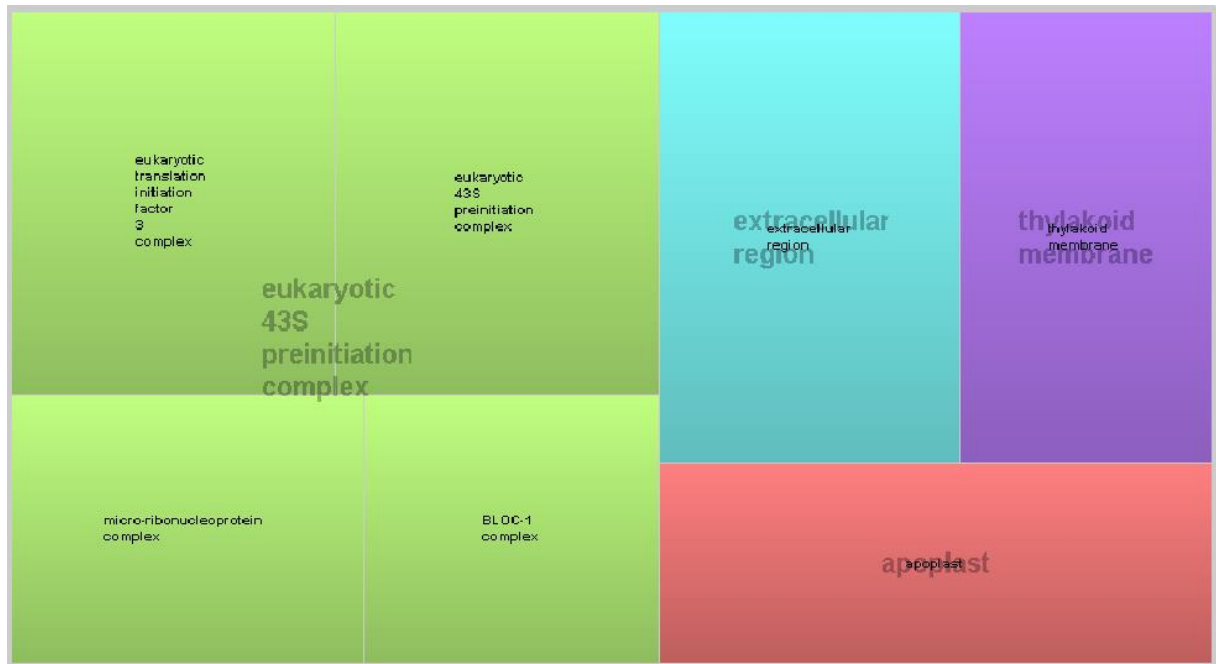


Figura 21: Treemap meristema, componente celular

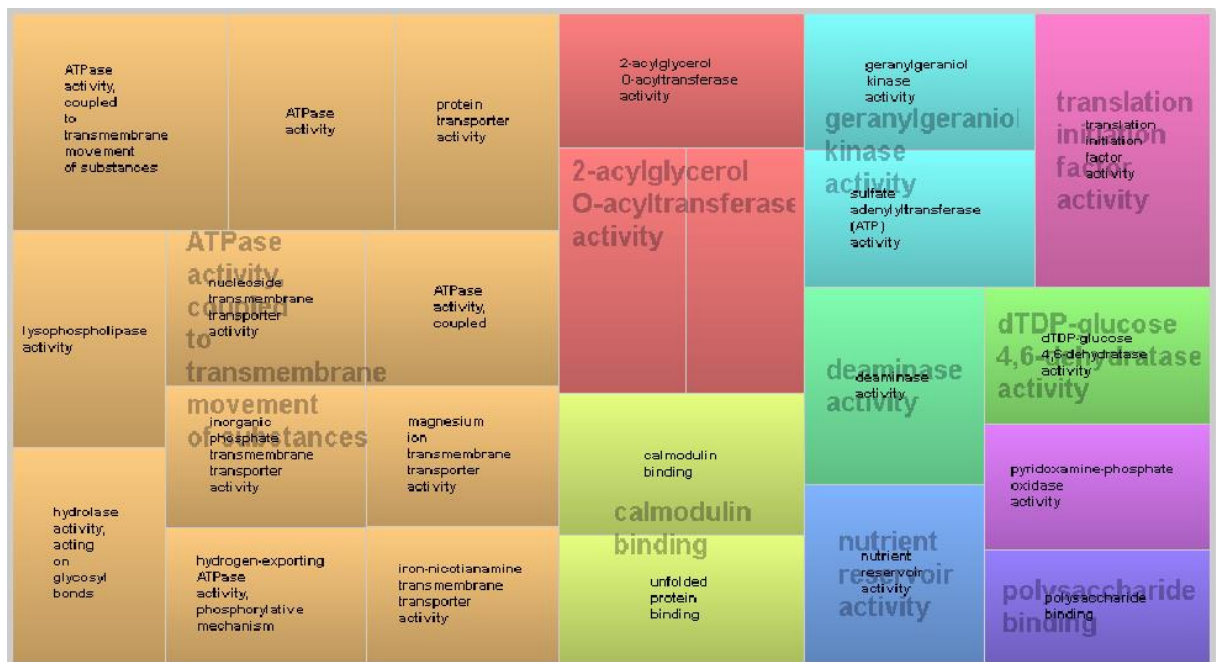


Figura 21: Treemap meristema, função molecular

Os termos enriquecidos na rede de meristema também enriquecidos entre os genes únicos das amostras do Pará foram: “respiratory burst involved in defense response”; “inorganic phosphate transmembrane transporter activity”; “pentose-phosphate shunt”.

Já entre os termos enriquecidos na rede e nos genes únicos das amostras de Santa Catarina, foram: “ATPase activity”; “pyridoxine biosynthetic process”; “N-acetyltransferase activity”; “pyridoxamine-phosphate oxidase activity”; “pyridoxal phosphate biosynthetic process” .

As categorias enriquecidas em comum entre os transcritos da rede de meristema e os transcritos com maior expressão nas amostras do Pará foram: “N-acetyltransferase activity”; “sulfate adenylyltransferase (ATP) activity”; “extracellular region”; “response to oxidative stress”.

Na análise do enriquecimento das categorias dos transcritos mais expressos nas amostras de Santa Catarina foram identificados termos que também foram enriquecidos na rede de meristema, como: “developmental process involved in reproduction”; “iron chelate transport”; “iron-nicotianamine transmembrane transporter activity”.

## 6. CONCLUSÕES

O uso de estudos genômicos em larga escala pode melhorar o entendimento de como plantas de mangue conseguem adaptar-se à hostil e instável zona intermarés. Deste modo, é possível avançar esse entendimento para o estudo de respostas ao estresse por plantas. Este estudo fornece recursos de alta qualidade para que se possa compreender a diversidade do perfil funcional de respostas ao estresse enfrentado por plantas de mangue.

A montagem *de novo* de um transcriptoma e a anotação funcional de aproximadamente 44% dos unigenes montados, traz novos conhecimentos sobre o genoma de *R. mangle*, tais como expressão de uma grande quantidade de genes de resposta ao estresse salínico, resposta a intensidades luminosas distintas, resposta a temperatura, resposta a doenças e estresse oxidativo. A análise de expressão diferencial de amostras de populações localizadas em dois extremos latitudinais da sua ocorrência na costa Atlântica da América do Sul permitiu explorar as características funcionais desta árvore com ampla distribuição por toda a costa brasileira. Além das diferentes características fisiológicas observadas em campo, tais como tamanho das raízes aéreas e porte das árvores, entre *R. mangle* do Pará e de Florianópolis, e das diferenças genéticas em locos SSR identificadas previamente por nosso grupo de trabalho (Francisco et al., 2014) neste trabalho foram verificadas diferenças na expressão de unigenes do transcriptoma, demonstrando a diversidade genética do ponto de vista funcional.

Generalizar respostas a futura mudanças ambientais de plantas, evolutivamente relacionadas ou não, é um grande desafio. A grande diversidade genética de *R. mangle* permitiu que uma mesma espécie responda de maneiras distintas aos desafios abióticos, respostas estas encontradas em diferentes níveis de expressão de genes associados a estresses e pressões ambientais. Deste modo, as ações de conservação devem ir no sentido de preservação de cada população, ressaltando a relevância de preservar o arsenal genético de cada região, como fonte de respostas específicas aos desafios atuais e futuros das mudanças ambientais.

## 7. PERSPECTIVAS

Uma vez traçado o perfil geral de transcritos da espécie e identificados os genes diferencialmente expressos em *R. mangle* com características interessantes a distinção das populações norte e sul, podem ser elaboradas questões com enfoque nos caracteres sob seleção. A presente descrição do perfil de expressão de populações distintas de *R. mangle* podem ser comparados com dados genômicos para fornecer base para detectar genes selecionados positivamente. O aumento de alelos vantajosos fornece um melhor fenótipo para a sobrevivência e reprodução gerando maior número de descendentes, de modo que estes alelos são mais propensos a se fixar na espécie. A compreensão da evolução adaptativa desta espécie de mangue é uma importante ferramenta para estudo de seleção positiva.

A colaboração com outros trabalhos no nosso grupo de estudo de espécies arbóreas de mangue (“Evolução de *Avicennia schaueriana* frente às mudanças climáticas históricas e futuras: genômica funcional e ecofisiologia”. Bolsa DR FAPESP# 13/26793-7 de Mariana Vargas Cruz e “Population and Functional Genomics on the evolutionary study of neotropical *Rhizophora* species in face of historical and current climate changes” do pós-doutorando Gustavo Maruyama Mori) podem também fornecer uma ampla descrição do perfil de expressão genômica de espécies extremófilas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arbeláez-Cortes, E., Castillo, M. E., Toro, N., Ca'rdenas, H. (2007). Genetic structure of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. *Hydrobiologia*, 583, pp. 321–330.
- Alongi, D. M., Tirendi, F., Clough, B. F. (2000). Below-ground decomposition of organic matter in forests of the mangrove *Rhizophora stylosa* and *Avicennia marina* along the arid coast of Western Australia. *Aquatic Botany*, 68, pp. 97–122.
- Alongi, D. M. (2002). Present state and future of the world's mangrove forests. *Environ Conserv.*, 29, pp. 331– 349.
- Alongi, D. M. (2008). Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 76, pp. 1–13.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler<sup>1</sup>, H., Cherry, J. M. Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G .M., Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25, pp. 25–9.
- Ball, M. C., Cocharane, M. J., Rawson, H. M. (1997). Growth and water use of the mangroves *Rhizophora apiculata* and *R. stylosa* in response to salinity and humidity under ambient and elevated concentrations of atmospheric CO<sub>2</sub>. *Plant. Cell. Environ.*, v. 20, n. 9, p. 1158-1166.
- Baehrecke, E.H., Dang, N., Babaria, K., Shneiderman, B. (2004). Visualization and analysis of microarray and gene ontology data with treemaps. *BMC Bioinformatics* 5:84
- Beaumont, L. J., Pitman, A., Perkins, S., Zimmermann, N. E., Yoccoz, N. G. and Thuiller, W. (2011). Impacts of climate change on the world's most exceptional ecoregions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, pp. 2306–11.
- Birzele, F., Schaub, J., Rust, W., Clemens, C., Baum, P., Kaufmann, H., Weith, A., Schulz, T. W., Hildebrandt, T. (2010). Into the unknown: expression profiling without genome sequence information in CHO by next generation sequencing. *Nucleic Acids Research*, 38, pp. 3999-4010.

- Cerón-Souza, I., Rivera-Ocasio, E., Medina, E., Jiménez, J. A., McMillan, W.O., Bermingham, E. (2010). Hybridization and introgression in New World red mangroves, *Rhizophora* (Rhizophoraceae). *Am J Bot*, 97, pp. 945–957.
- Cerón-Souza, I., Bermingham, E., McMillan, W. O., Jones, F. A. (2012). Comparative genetic structure of two mangrove species in Caribbean and Pacific estuaries of Panama. *BMC evolutionary biology*, 12, pp. 205.
- Cheong, S., Silliman, B., Wong, P. P., van Wesenbeeck, B., Kim, C., Guannel, G. (2013). Coastal adaptation with ecological engineering. *Nature Climate Change*, 3, pp. 787–791.
- Cohen, M. C. L., Lara, R. J., Smith, C. B., Matos, H. R. S., Vedel, V. (2009). Impact of sea-level and climatic changes on the Amazon coastal wetlands during the late Holocene. *Vegetation History and Archaeobotany*, 18, pp. 425–439.
- Cohen, M. C. L., Lara, R. J., Smith, C. B., Angelica, R. S., Dias, B. S., Pequeno, T. (2008). Wetland dynamics of Marajó Island, northern Brazil during the last 1000 years. *Catena*, 76, pp. 70–77.
- Crawford, J. E., Guelbeogo, W. M., Sanou, A., Traore, A., Vernick, K. D., Sagnon, N'F., Lazzaro, B. P. (2010). *De novo* transcriptome sequencing in *Anopheles funestus* using Illumina RNA-seq technology. *PLoS One*, 5, 14202.
- Cunha-Lignon, M., Coelho Jr, C., Almeida, R., Menghini, R. P., Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón, G., Dahdouh-Guebas, F. (2011). Characterisation of mangrove forest types in view of conservation and management: a review of mangals at the Cananéia region, São Paulo State, Brazil. *Journal of Coastal Research*, 57, pp. 349 – 353.
- Dassanayake, M., Haas, J. S., Bohnert, H. J., Cheeseman, J. M. (2009). Shedding light on an extremophile lifestyle through transcriptomics. *The New Phytologist*, 183, pp.764–75.
- Dassanayake, M., Haas, J. S., Bohnert, H. J., Cheeseman, J. M. (2010). Comparative Transcriptomics for Mangrove Species: An Expanding Resource, Functional and Integrative Genomics, 10(4), pp. 523-32.
- Dinerstein, E., Olson, D., Graham, D., Webster, A., Primm, S., Bookbinder, M., Ledec, G. (1995). A Conservation Assessment of the Terrestrial Eco-regions of Latin America and the Caribbean. The World Bank & World Wildlife Fund. Washington, DC.



- Duke, N. C., Meynecke, J. O., Dittman, S., Ellison, A. M., Anger, K., Berger, U., Cannicci, S., Diele, K., Ewel, K. C., Field, C. D., Koedam, N., Lee, S. Y., Marchand, C., Nordhaus, I. and Dahdouh-Guebas F. (2007). A world without mangroves? *Science*, 317, pp. 41–43.
- Ellison, J. C. (1991). The pacific palaeogeography of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 105, pp. 271–284.
- FAO. (2003). Status and trends in mangrove area extent worldwide. Forest Resources Division. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Ferreira, T. O., Otero, X. L., Vidal-Torrado, P., Macias, F. (2007). Redox processes in mangrove soils under *Rhizophora mangle* in relation to different environmental conditions. *Soil Science Society of American Journal*, 71, pp. 484–491.
- Gilman, E. L., Ellison, J., Duke, N. C., Field, C. (2008). Threats to mangroves from climate change and adaptation options: A review. *Aquatic Botany*, 89, pp. 237–250.
- Gornitz, V. (1991). Global coastal hazards from future sea level rise, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, Global Planetary Change Section, 89, pp. 79–398.
- Graham, A. (2006). Paleobotanical evidence and molecular data in reconstructing the historical phytogeography of Rhizophoraceae. *Ann Missouri Bot Gard*, 93, pp. 325–334.
- Inane, G., Zhang, Q., Li, P., Wang, Z., Cao, Z., Zhang, H., Zhang, C., Quist, T. M., Goodwin, S. M., Zhu, J. Shi, H., Damsz, B., Charbaji, T., Gong, Q., Ma, S., Fredricksen, M., Galbraith, D. W., Jenks, M. Q., Rhodes, D., Hasegawa, P. M., Bohnert, H. J., Joly, R. J., Bressan, R. .A., Zhu J. K. (2004) . Salt cress. A halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development in extremophiles. *Plant Physiology*, 135, pp. 1718–1737.
- Jeon J, Kim NY, Kim S, Kang NY, Novák O, Ku SJ, Cho C, Lee DJ, Lee EJ, Strnad M, et al. (2010) A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in Arabidopsis. *J Biol Chem* 285: 23371–23386
- Kathiresan, K. & Rajendran, N. (2005). Coastal mangrove forests mitigated tsunami. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65, pp. 601–606.

Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Katayama, T., Kawashima, S., Okuda, S., Tokimatsu, T., Yamanishi, Y. (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research*, 36, pp. 480–4.

Koch, E. W., Barbier, E. B., Silliman, B. R., Reed, D. J., Perillo, G. M. E., Hacker, S. D., Granek, E. F., Primavera, J. H., Muthiga, N., Polasky, S., Halpern, S. B., Kennedy, C. J., Kappel, C. V., Wolanski, E. (2009). Non-linearity in ecosystem services: Temporal and spatial variability in coastal protection. *Frontiers in Ecology and Environment*, 7, pp. 29–37.

Krauss, K. W., Lovelock, C. E., McKee, K. L., López-Hoffman, L., Ewe, S. M. L. , Sousa, W. P. (2008). Environmental drivers in mangrove establishment and early development: a review. *Aquatic Botany*, 89, pp. 105–127.

Krauss, K. W., McKee, K. L., Lovelock, C. E., Cahoon, D. R., Saintilan, N., Reef, R., Chen, L. (2014). How mangrove forests adjust to rising sea level. *New Phytologist*, 202, pp. 19–34.

Lara, R. J. & Cohen, M. C. L. (2009). Palaeolimnological studies and ancient maps confirm secular climate fluctuations in Amazonia. *Climatic Change*, 94, pp. 399–408.

Lara, R. J., Cohen, M. C. L., Szlafsztein, C. (2010). Drivers of Temporal Changes in Mangrove Vegetation Boundaries and Consequences for Land Use. *Mangrove Dynamics and Management in North Brazil Ecological Studies*. 211, pp. 127-141.

Lopez-Huertas, E., Charlton, W.L. , Johnson, B., Graham, I.A., Baker A. 2000. Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.*, 19 (2000), pp. 6770–6777

Loarie, S. R., Duffy, P. B., Hamilton, H., Asner<sup>1</sup>, G. P., Field, C. B., Ackerly, D. D. (2009). The velocity of climate change. *Nature*, 462, pp.1052–1055.

Mendoza, U. N., Cruz, C. C., Menezes, M. P., Lara, R. J. (2012). Flooding effects on phosphorus dynamics in an Amazonian mangrove forest, Northern Brazil.(Report). *Plant and Soil*, 353(1-2), pp.107-121.

Maia, L. P., Lacerda, L. D., Monteiro, L. H. U., Souza, G. M. E. (2006). Atlas dos Manguezais do Nordeste: Avaliação das Áreas de Manguezal dos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Superintendência Estadual do Meio Ambiente, Fortaleza.

Mitsuya, S., El-Shami, M. , Sparkes, I.A. , Charlton, W.L. , Lousa M. , Johnson, Cde, B. , Baker A. 2010. Salt stress causes peroxisome proliferation, but inducing peroxisome proliferation does not improve NaCl tolerance in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One, 5 (2010), p. e9408.

McDowell, N. G. (2011). Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiology*, 155, pp. 1051–1059.

Menezes, M. P. M., Oliveira, D., Melo, C. F. (1997). Pollination of red mangrove, *Rhizophora mangle*, in northern Brazil. *Acta Horticulturae*, 437, pp. 431-434.

Menezes, M. P. M., Berger, U., Mehlig, U. (2008). Mangrove vegetation in Amazonia: a review of studies from the coast of Pará and Maranhão states, north Brazil. *Acta Amazonica* 38(3), pp. 403-420.

Muller, J. & Caratini, C. (1977). Pollen of *Rhizophora* (Rhizophoraceae) as a guide fossil. *Pollen et Spores*, 19, pp. 361–390.

Nettel, A. & Dodd, R. S. (2007). Drifting propagules and receding swamps: Genetic footprints of mangrove recolonization and dispersal along tropical coasts. *Evolution*, 61, pp. 958–971.

Notebaart, R. A., Huynen, M. A., Teusink, B., Siezen, R. J., Snel, B. (2005). Correlation between sequence conservation and the genomic context after gene duplication. *Nucleic Acids Res*, 33, pp.7176.

Núñez-Farfán, J., Domínguez, C. A., Eguiarte, L. E., Cornejo, A., Quijano, M., Vargas, J., Dirzo, R., (2002). Genetic divergence among Mexican populations of red mangrove (*Rhizophora mangle*): geographic and historic effects. *Evolutionary Ecology Research*, 4, pp. 1049-1064.

Oliveira, P. M. F., Mori, G. M., Souza, A. P. (2013). Investigation of the population genetics of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the Brazilian coast using microsatellite markers. *Anais do 60º Congresso Brasileiro de Genética*.

Otinto, A., Acyoli, A. C., Gondim, D. O., Basto, E. R., Espindula, J., Silava, M. M., Lins, V. B. (2003). O ecossistema manguezal. [S.I.]: Gerenciamento costeiro de Pernambuco.

- Pavey, S. A., Bernatchez, L., Aubin-Horth, N., Landry, C. R. (2012). What is needed for Next-generation ecological and evolutionary genomics? *Trends in Ecology and Evolution*, 27, pp. 673-8.
- Pauls, S. U., Nowak, C., Bálint, M., Pfenninger, M. (2013). The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology*, 22, pp. 925-46.
- Pessenda, L. C. R., Vidotto, E., De Oliveira, P. E., Buso, A. A., Cohen, M. C. L., Rossetti, D. de F., Ricardi-Branco, F., Bendassolli, J. A. (2012). Late Quaternary vegetation and coastal environmental changes at Ilha do Cardoso mangrove, southeastern Brazil . *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 363-364, pp.57-68.
- Pil, M. W., Boeger, M. R., Muschner, V. C, Pie, M. R., Ostrensky, A., Boeger, W. A. (2011). Postglacial nortsouth expansion of populations of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the Brazilian coast revealed by microsatellite analysis. *American Journal of Botany*, 98, pp. 1031-9.
- Plaziat, J. C., Cavagnetto, C., Koeniguer, J. C., Baltzer, F. (2001). History and biogeography of the mangrove ecosystem, based on a critical reassessment of the paleontological record. *Wetlands Ecol Manage*, 9, pp. 161–180.
- Rabinowitz, D. (1978). Dispersal properties of mangrove propagules. *Biotropica*, 10, pp. 47–57.
- Rosado A, Schapire A.L, Bressan R.A, Harfouche A.L, Hasegawa, P.M, Valpuesta V and Botella M.A. 2006 . The Arabidopsis tetratricopeptide repeat-containing protein TTL1 is required for osmotic stress responses and abscisic acid sensitivity. *Plant Physiol* . 142, 1113–1126.
- Rosero, C., Gaitan, E., Cardenas, H., Toro, N., Tohme, J. (2002). Polymorphic microsatellites in a mangrove species, *Rhizophora mangle* L. (Rhizphoraceae). *Mol Ecol Notes*, 2, pp. 281–283.
- Sinclair, A.M., Trobacher, C.P., Mathur, N. , Greenwood, J.S. , Mathur J. 2009. Peroxule extension over ER defined paths constitutes a rapid subcellular response to hydroxyl stress. *Plant J.*, 59 (2) (2009), pp. 231–242

Sandoval-Castro, E., Muñiz-Salazar, R., Enríquez-Paredes, L. M., Riosmena-Rodríguez, R., Dodd, R. S., Tovilla-Hernández, C., Arredondo-García, M. C. (2012). Genetic population structure of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) along the northwestern coast of Mexico. *Aquat Bot*, 99, pp. 20–26.

Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Adaime, R. R. (1990). Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. *Estuaries*, 13, pp. 204-218.

Steele, O. C. (2006). Natural and anthropogenic biogeography of mangroves in the southwest Pacific, Master Thesis. USA: University of Hawai'i. Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G. K., Tignor, M., Allen, S. K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V.,

Midgley, P. M. (2013). IPCC, 2013: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Takayama, K., Tamura, E. M., Tateishi, E. Y., Kajita, T. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in the red mangrove *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) and its related species. *Conserv Genet*, 9, pp. 1323–1325.

Takayama, K., Tamura, E. M., Tateishi, E. Y., Webb, E. L., Kajita, T. (2013). Strong genetic structure over the American continents and transoceanic dispersal in the mangrove genus *Rhizophora* (Rhizophoraceae) revealed by broad-scale nuclear and chloroplast DNA analysis. *Am. J. Bot*, 100 (6), pp. 1191-1201.

Tomlinson, P. B., Ashton, P. S., Hubbel, S. P., Janzen, D. H., Raven, P. H. (1986). *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press, Cambridge, MA, pp. 419.

Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20623–20628

Twilley, R. R. (1995). Properties of mangrove ecosystems related to the energy signature of coastal environments. In *Maximum power: The ideas and Applications of H T Odum*. Edited by Hall CAS. Niwot: University Press of Colorado, pp. 43–62.

- Valiela, I., Bowen, J. L., York, J. K. (2001). Mangrove forests: one of the world's threatened major tropical environments. *Bioscience*, 51, pp. 807-815.
- Zhao, J., Hartmann, H., Trumbore, S., Ziegler W, Zhang Y. (2013). High temperature causes negative wholeplant carbon balance under mild drought. *New Phytologist*, 200, pp. 330-339.
- Zhang, X. M., Zhao, L., Larson-Rabin, Z., Li, D. Z., Guo, Z. H. (2012). *De novo* sequencing and characterization of the floral transcriptome of *Dendrocalamus latiflorus* (Poaceae: Bambusoideae). *PLoS One*, 7(8), pp. 0042082.
- Adaime, R.R. (1985). “Produção do bosque de mangue da Gamboa Nóbrega (Cananéia, 25° Lat S -Brasil)”. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico.
- Bhattacharjee, S.; Saha, A. (2014). “Plant water-stress response mechanisms”. In: Gaur RK & Sharma P (Eds.), *Approaches to Plant Stress and their Management*, Springer. p149-172.
- Boyer, J.S.; Westgate, M.E. (2004). “Grain yields with limited water”. *J Exp Bot.* v55(407), p2385-2394.
- Chao DY, Dilkes B, Luo H, Douglas A, Yakubova E, Lahner B, Salt DE (2013) Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science* 341, 658–659.
- Chen, J.; Xiao, Q.; Wu, F.H.; Dong, X.J., He, J.X.; Pei, Z.M.; Zheng, H.L. (2010). “Nitric oxide enhances salt secretion and Na<sup>+</sup> sequestration in a mangrove plant, *Avicennia marina*, through increasing the expressions of H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter under high salinity” *Tree Physiol.* v30, p1570–1585.
- Chen, S.; Zhou, R.; Huang, Y.; Zhang, M.; Yang, G.; Zhong, C.; Shi, S. (2011). “Transcriptome sequencing of a highly salt tolerant mangrove species *Sonneratia alba* using Illumina Platform”. *Mar. Genomics.* v 4, p129–136.
- Chen, J.; Wang, W.H.; Liu, T.W.; Wu, F.H.; Zheng, H.L (2013). “Photosynthetic and antioxidant responses of *Liquidambar formosana* and *Schima superba* seedlings to sulfuric-rich and nitric-rich simulated acid rain” *Plant Physiol. Biochem.* v64, p41–51.
- Chen, J.; Xiaob, Q.; Wangc, C.; Wanga, W.H.; Wua, F.W.; Chena, J.; Hed, B.Y.; Zhua, Z.; Rua, Q.M.; Zhanga, L.L.; Zhenga, H.L. (2014). “Nitric oxide alleviates oxidative stress

caused by salt in leaves of a mangrove species, *Aegiceras corniculatum*". *Aquatic Botany*. v117, p41-47.

Coley, P.D.; Bryant, J.P.; Chapin, F.S. (1985). "Resource availability and plant antiherbivore defense". *Science*. v230, p895-899.

Dassanayake, M.; Haas, J.S.; Bohnert, H.J.; Cheeseman, J.M. (2009). "Shedding light on an extremophile lifestyle through transcriptomics". *New Phytol*. v183, p764–775.

Duke, N. C. (2006). *Australia's Mangroves. The Authoritative Guide to Australia's Mangrove Plants*. Brisbane: The University of Queensland and Norman C Duke, p0-200.

Gershenzon, J. (1984). "Changes in the levels of plant secondary metabolite production under water and nutrient stress". *Recent Adv. Phytochem*. v18, p273-320.

Godoy, S.A.P.; Mayworm, M.A.S.; Lo, V.K.; Salatinol, A., Schaeffer-Novelli, Y. (1997). "Teores de ligninas, nitrogênio e taninos em folhas de espécies típicas do mangue". *Rev. bras. Bot*. v20(1), p35-40.

Huang, J.; Lu, X.; Yan, H.; Chen, S.; Zhang, W.; Huang, R.; Zheng, Y. (2012). "Transcriptome characterization and sequencing-based identification of salt-responsive genes in *Millettia pinnata*, a semi-mangrove plant". *DNA Res*. v19, p195–207.

Huang, J.; Lu, X.; Zhang, W.; Huang, R.; Chen, S.; Zheng, Y. (2014). "Transcriptome sequencing and analysis of leaf tissue of *Avicennia marina* using the Illumina platform". *Plos One*. v9, p108785.

Jung JK, McCouch S (2013) Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science* 4, 186

Kosturkova, G.; Todorova, R.; Sakthivelu, G.; Akitha Devi, M.K.; Giridhar, P. (2008). "Response of bulgarian and indian soybean genotypes to drought and water deficiency in field and laboratory conditions". *Plant Physiology*. v34(3-4), p239-250.

Ksouri, R.; Megdiche, W.; Debez, A.; Falleh, H.; Grignon, C.; Abdelly, C. (2007). "Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*". *Plant Physiol. Biochem*. V45, p244–249.

- Liang, S.; Fang, L.; Zhou, R.; Tang, T.; Deng, S.; Dong, S.; Huang, Y.; Zhong, C.; Shi, S. (2012). “Transcriptional homeostasis of a mangrove species, *Ceriops tagal*, in saline environments, as revealed by microarray analysis”. Plos One. v7, p36499.
- Lin, P.; Shen, R.; Lu, C. (1994). “The characteristics of chilling-resistance on six mangrove plants”. J Xiamen Univ. v33, p249–252.
- Lu, Y.; Li, N.; Sun, J.; Hou, P.; Jing, X.; Zhu, H.; Deng, S.; Han, Y.; Huang, X.; Ma, X.; Zhao, N.; Zhang, Y.; Shen, X.; Chen, S. (2013). “Exogenous hydrogen peroxide, nitric oxide and calcium mediate root ion fluxes in two non-secreter mangrove species subjected to NaCl stress”. Tree Physiol. v33, p81–95.
- Marshall, A.; Aalen, R.B.; Audenaert, D.; Beeckman, T.; Broadley, M.R. (2012). “Tackling drought stress: receptor-like kinases present new approaches”. The Plant Cell. v24(6), p2262–2278.
- Mishra, S.; Das, A.B. (2003). “Effect of NaCl on leaf salt secretion and antioxidative enzyme level in roots of a mangrove, *Aegiceras corniculatum*” Indian J. Exp. Biol, v41, p160–166.
- Parida, A.K.; Jha, B. (2010). “Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review”. Trees-Struct. Funct. v24, p199–217.
- Peng, Y.L.; Wang, Y.S.; Cheng, H.; Wang, L.Y. (2015). “Characterization and expression analysis of a gene encoding CBF/DREB1 transcription factor from mangrove *Aegiceras corniculatum*”. Ecotoxicology. p1573–3017.
- Quisthoudt, K.; Schmitz, N.; Randin, C.F. (2012). “Temperature variation among mangrove latitudinal range limits worldwide”. Tree Struct Funct. v26, p1919–1931.
- Radwan, O. (2015). “Genomics Improvement of Agronomic Crops to Abiotic. Stress.” Journal of Investigative Genomics. v2, p3.
- Rajaravindran, M.; Natarajan, S. (2012). “Effect of NaCl stress on biochemical and enzymes changes of the halophyte *Suaeda maritima* Dum”. Int. J. Res. Plant Sci. v2, p1–7.
- Tan, W.K.; Lin, Q.; Lim, T.M.; Kumar, P.; Loh, C.S. (2013). “Dynamic secretion changes in the salt glands of the mangrove tree species *Avicennia officinalis* in response to a changing saline environment”. Plant Cell Environ. v36. p1410–1422.



Yang, Y.; Yang, S.; Li, J.; Li, X.; Zhong, C.; Huang, Y.; Zhou, R. and Shi, S. (2015). “*De novo* assembly of the transcriptomes of two yellow mangroves, *Ceriops tagal* and *C. zippeliana*, and one of their terrestrial relatives, *Pellacalyx yunnanensis*”. *Marine Genomics*. v(15)00058-6, p1874-7787.

Wang, Y.; Zhu, H.; Tam, N.F.Y. (2013). “Polyphenols, tannins and antioxidant activities of eight true mangrove plant species in South China”. *Plant Soil*, v374, p. 549–563.

Wang, L.; Liu, X.; Liang, M.; Tan, F.; Liang, W.; Chen, Y.; Lin, Y.; Huang, L.; Xing, J.; Chen, W. (2014). “Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove *Kandelia candel* during short-term stress” *Plos One*, v9, p83141.

Zheng, H.L.; Lin, P. (1998). “Effect of salinity on membrane protection system for *Bruguiera sexangula* and *Bruguiera gymnorhiza* seedling”. *J. Xiamen Univ. (Nat. Sci.)*. v37, p278–282.

Zhu, Z.; Zhang, R.F.; Liu, T.W.; Zheng, H.L (2011). “Solute accumulation and osmotic adjustment characteristics of the mangrove *Avicennia marina* under NaCl-induced salinity stress”. *Bot. Mar.* v54, p335–341.

Zhu, Z.; Chen, J.; Zheng, H.L. (2012). “Physiological and proteomic characterization of salt tolerance in a mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam” *Tree Physiol.* v32, p1378–1388.

Zucker, W.Z. (1983). “Does structure determine function? An ecological perspective”. *Am. Nat.* v121, p335-365.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1: Declaração de Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



### DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Análise do transcriptoma de rhizophora mangle: adaptações de árvores extremófilas em um cenário de mudanças climáticas*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) aluno(a): Stephanie Karenina Bajay

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): Anete Pereira de Souza

Prof. Dra. Anete P. de Souza  
Matrícula: 24994-7  
CBMEG - UNICAMP

Data: 05/06/2017


## 9.2. Anexo 2: Declaração Referente a Direitos Autorais

**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **“Análise do transcriptoma de *Rhizophora mangle*: adaptações de árvores extremófilas em um cenário de mudanças climáticas”**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 05 de junho de 2017

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **Stephanie Karenina Bajay**  
RG n.º 35838266x

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Anete Pereira de Souza**  
RG n.º 8680325